

Novel elongase gene and method for producing multiple-unsaturated fatty acids

Publication number: JP2003523746T

Publication date: 2003-08-12

Inventor:

Applicant:

Classification:






- international: **C12N9/10; C12N15/54; C12N15/82; C12P7/64; C12N9/10; C12N15/54; C12N15/82; C12P7/64;** (IPC1-7): C12N15/09; A01H5/00; A01K67/027; A23K1/16; A23L1/30; A61K7/00; A61K31/201; A61K31/202; A61P3/02; A61P3/06; A61P9/10; A61P29/00; C07K16/40; C11C3/00; C12N9/00; C12P7/64; C12Q1/02

- european: C12N9/10C1; C12N15/82C4B4; C12P7/64

Application number: JP20010558464T 20010208

Priority number(s): DE20001005973 20000209; DE20001023893 20000517; DE20001063387 20001219; WO2001EP01346 20010208

Also published as:

 WO0159128 (A3)
 WO0159128 (A2)
 US2004111763 (A1)
 MXPA02007078 (A)
 EP1254238 (A0)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP2003523746T

Abstract of corresponding document: **US2004111763**

The invention relates to a novel elongase gene with the sequences stated in sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 and SEQ ID NO: 7 or their homologs, derivatives or analogs, to a gene construct comprising this gene or its homologs, derivatives and analogs, and to its use. The invention also relates to vectors or transgenic organisms comprising an elongase gene with the sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 and SEQ ID NO: 7 or its homologs, derivatives and analogs. The invention furthermore relates to the use of the elongase gene sequences alone or in combination with further elongases and/or further fatty acid biosynthesis genes. The present invention relates to a novel elongase gene with the sequence SEQ ID NO:1 or its homologs, derivatives and analogs. Furthermore, the invention relates to a process for the preparation of polyunsaturated fatty acids and to a process for introducing DNA into organisms which produce large amounts of oils and, in particular, oils with a high content of unsaturated fatty acids. Moreover, the invention relates to an oil and/or a fatty acid preparation with a higher content of polyunsaturated fatty acids with at least two double bonds and/or a triacylglycerol preparation with a higher content of polyunsaturated fatty acids with at least two double bonds.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE LEFT BLANK

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2003-523746
(P2003-523746A)

(43) 公表日 平成15年8月12日 (2003.8.12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		A 0 1 K 67/027	2 B 1 5 0
A 0 1 K 67/027		A 2 3 K 1/16	3 0 1 F 4 B 0 1 8
A 2 3 K 1/16	3 0 1		3 0 4 C 4 B 0 2 4
	3 0 4	A 2 3 L 1/30	B 4 B 0 5 0
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 156 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-558464(P2001-558464)
 (86) (22) 出願日 平成13年2月8日(2001.2.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年8月7日(2002.8.7)
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 0 1 / 0 1 3 4 6
 (87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 5 9 1 2 8
 (87) 国際公開日 平成13年8月16日(2001.8.16)
 (31) 優先権主張番号 1 0 0 0 5 9 7 3 . 2
 (32) 優先日 平成12年2月9日(2000.2.9)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (D E)
 (31) 優先権主張番号 1 0 0 2 3 8 9 3 . 9
 (32) 優先日 平成12年5月17日(2000.5.17)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 ビーエーエスエフ アクチエンゲゼルシャ
フト
ドイツ連邦共和国 デー-67056 ルート
ビヒシャフェン (番地なし)
 (72) 発明者 ハインツ, エルンスト
ドイツ連邦共和国 22609 ハンブルグ,
ビュートカンブスウェグ 13
 (72) 発明者 ツァンク, トルステン
ドイツ連邦共和国 22303 ハンブルグ,
ロレンツェンガッセ 13
 (74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規エロンガーゼ遺伝子および高度不飽和脂肪酸の生産方法

(57) 【要約】

本発明は、配列番号1、配列番号3、配列番号5もしくは配列番号7に示した配列を有する新規エロンガーゼ遺伝子、またはその相同体、誘導体もしくは類似体に関する。本発明はまた、上記遺伝子、またはその相同体、誘導体もしくは類似体を含有する遺伝子構築物、ならびにその使用に関する。本発明はさらに、配列番号1、配列番号3、配列番号5もしくは配列番号7に示した配列を有するエロンガーゼ遺伝子、またはその相同体、誘導体もしくは類似体を含有するベクターまたはトランスジェニック生物に関する。本発明は、上記エロンガーゼ配列を単独でまたは別のエロンガーゼおよび/または別の脂肪酸生合成遺伝子と組み合わせて使用することに関する。本発明は、配列番号1に示した配列を有する新規エロンガーゼ遺伝子、またはその相同体、誘導体もしくは類似体に関する。さらに、本発明は、高度不飽和脂肪酸の生産方法、ならびに、大量の油（特に、高含量の不飽和脂肪酸を含む油）を産生する生物にDNAを導入する方法に関する。加えて、本発明は、少なくとも2個の二重結合がある高度不飽和脂肪酸を高含量で含む油および/

または脂肪酸調製物、および/または、少なくとも2個の二重結合がある高度不飽和脂肪酸を高含量で含むトリアシルグリセロール調製物に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合がある C_{16} -、 C_{18} -または C_{20} -脂肪酸を2炭素原子以上伸長させるポリペプチドをコードする、植物または藻類に由来する単離された核酸。

【請求項2】 脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合がある C_{16} -、 C_{18} -または C_{20} -脂肪酸を伸長させるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸であって、

- a) 配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7に示した核酸配列、
 - b) 遺伝子コードの縮重に従って配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7に示した配列から誘導される核酸配列、
 - c) 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号8に示したアミノ酸配列のポリペプチドをコードする配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号7に示した配列の誘導体であって、該ポリペプチドの酵素作用を実質的に低下させることなくアミノ酸レベルで少なくとも50%の相同性を有する該誘導体、
- からなる群より選択される、上記核酸。

【請求項3】 前記配列が植物、藻類または真菌に由来するものである、請求項2に記載の単離された核酸。

【請求項4】 前記配列がツリガネゴケ属(Physcomitrella)、ヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)またはクリプテコジニウム属(Crypthecodinium)に由来するものである、請求項2に記載の単離された核酸。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸を含み、該核酸が1つ以上の調節シグナルと機能的に連結されている、遺伝子構築物。

【請求項6】 遺伝子発現が調節シグナルにより増強される、請求項5に記載の遺伝子構築物。

【請求項7】 請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸配列または請求項5もしくは6に記載の遺伝子構築物と、さらに、少なくとも1つの脂肪酸生合成遺伝子をコードする核酸とを含む遺伝子構築物。

【請求項8】 脂肪酸生合成遺伝子をコードする核酸が、 $\Delta 19$ -、 $\Delta 17$ -、 $\Delta 15$ -、 $\Delta 12$ -、 $\Delta 9$ -、 $\Delta 8$ -、 $\Delta 6$ -、 $\Delta 5$ -、 $\Delta 4$ -デサチュラーゼ、各種ヒドロキシラーゼ、 $\Delta 12$ -アセチレナーゼ、アシル-ACPチオエステラーゼ、 β -ケトアシル-ACPシンターゼ、または β -ケトアシル-ACPレダクターゼからなる群より選択される、請求項7に記載の遺伝子構築物。

【請求項9】 請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸配列、または請求項5～8のいずれか1項に記載の遺伝子構築物によりコードされるアミノ酸配列。

【請求項10】 請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸、または請求項5～8のいずれか1項に記載の遺伝子構築物を含有するベクター。

【請求項11】 少なくとも1つの請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸、請求項5～8のいずれか1項に記載の遺伝子構築物、または請求項10に記載のベクターを含有する生物。

【請求項12】 微生物、動物または植物である、請求項11に記載の生物。

【請求項13】 トランスジェニック植物である、請求項11または12に記載の生物。

【請求項14】 請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸によりコードされるポリペプチドと特異的に結合する抗体。

【請求項15】 請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸の相補配列を含むアンチセンス核酸分子。

【請求項16】 脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合がある C_{16} -、 C_{18} -または C_{20} -脂肪酸を2炭素原子以上伸長させるポリペプチドをコードする請求項1に記載の核酸、請求項6に記載の遺伝子構築物、または請求項10に記載のベクターを含有する生物を、高度不飽和脂肪酸が該生物において産生される条件下で培養することを含んでなる、高度不飽和脂肪酸の生産方法。

【請求項17】 産生される高度不飽和脂肪酸が、脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合がある C_{18} -、 C_{20} -または C_{22} -脂肪酸分子である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 C_{18} -、 C_{20} -または C_{22} -脂肪酸分子を油、脂質または遊離脂肪酸の形で前記生物から単離する、請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】 前記生物が微生物、動物または植物である、請求項16～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】 前記生物がトランスジェニック植物である、請求項16～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】 C_{16} -、 C_{18} -または C_{20} -脂肪酸が分子中に3個の二重結合をもつ脂肪酸である、請求項16～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】 請求項16～21のいずれか1項に記載の方法により得られる油、脂質もしくは脂肪酸、またはその画分。

【請求項23】 高度不飽和脂肪酸を含む、トランスジェニック植物に由来する油、脂質または脂肪酸組成物。

【請求項24】 高度不飽和脂肪酸が、請求項1～4のいずれか1項に記載のヌクレオチド配列、請求項5～8のいずれか1項に記載の遺伝子構築物、請求項15に記載のアンチセンス核酸分子、または請求項10に記載のベクターを含有するトランスジェニック植物に由来する、請求項23に記載の油、脂質または脂肪酸組成物。

【請求項25】 飼料、食物、化粧品または医薬品における請求項22～24のいずれか1項に記載の油、脂質または脂肪酸組成物の使用。

【請求項26】 請求項14に記載の抗体、請求項15に記載のアンチセンス核酸分子、または請求項28に記載のアンタゴニストもしくはアゴニストを含有する組成物。

【請求項27】 請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸、請求項5～8のいずれか1項に記載の遺伝子構築物、請求項15に記載のアンチセンス核酸分子、請求項14に記載の抗体、請求項28に記載のアンタゴニストもしくはアゴニスト、請求項26に記載の組成物、請求項9に記載のアミノ酸配列、および／または、請求項22～24のいずれか1項に記載の油、脂質および／または脂肪酸、またはその画分を含んでなるキット。

【請求項28】 エロンガーゼのアンタゴニストまたはアゴニストの同定方

法であって、

- a) 本発明のポリペプチドを発現する細胞に候補物質を接触させ、
- b) 高度不飽和脂肪酸特異的エロンガーゼ(PSE)活性を試験し、
- c) そのPSE活性を、候補物質の非存在下での標準活性と比較する、

ことを含んでなり、その際、標準活性より高いPSE活性は、その候補物質がアゴニストであることを示し、標準活性より低いPSE活性は、その候補物質がアンタゴニストであることを示す、上記方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の利用分野**

本発明は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、もしくは配列番号11に示した配列を有する新規エロンガーゼ遺伝子、またはその相同体、誘導体もしくは類似体、および上記遺伝子またはその相同体、誘導体もしくは類似体を含む遺伝子構築物、ならびにその使用に関するものである。本発明はまた、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、もしくは配列番号11に示した配列を有する新規エロンガーゼ遺伝子、またはその相同体、誘導体もしくは類似体を含むベクターまたはトランスジェニック生物に関する。本発明はさらに、上記エロンガーゼ遺伝子配列を、単独でまたは追加のエロンガーゼおよび／または追加の脂肪酸生合成遺伝子と組み合わせて、使用することに関する。本発明は、配列番号1に示した配列を有する新規エロンガーゼ遺伝子、またはその相同体、誘導体もしくは類似体に関する。

【0002】

さらに、本発明は、高度不飽和脂肪酸の生産方法、ならびに、大量の油（特に、高含量の不飽和脂肪酸を含む油）を産生する生物にDNAを導入する方法に関する。加えて、本発明は、少なくとも2個の二重結合がある高度不飽和脂肪酸をより高い含量で含む油および／または脂肪酸調製物、および／または、少なくとも2個の二重結合がある高度不飽和脂肪酸をより高い含量で含むトリアシルグリセロール調製物に関する。

【0003】**発明の背景**

細胞の天然の代謝過程で生じるいくつかの産物および副産物は、動物飼料産業、食品産業、化粧品産業、医薬品産業を含めて、様々な産業において使用されている。まとめて「ファインケミカル」(fine chemical)と呼ばれているこうした分子には、さらに脂質と脂肪酸が含まれ、中でも高度不飽和脂肪酸が1つのクラスの例を構成している。例えば、高度不飽和脂肪酸(PUFA)は、小児用配合物にその栄養価を高める目的で添加される。また、PUFAはヒトの血中コレステロールレ

ベルを下げるように作用し、したがって心臓病の予防に適している。ファインケミカルおよび高度不飽和脂肪酸(PUFA)は魚や微生物などの動物源から単離することができる。これらの微生物を培養することで、1種以上の所望の分子を大量に生産し、単離することが可能となる。

【0004】

PUFAの生産に特に適している微生物は、ヤブレッツボカビ属(*Thraustochytria*)またはシゾキトリウム属(*Schizochytria*)の系統のような微生物、海洋性ケイ藻(*Phaeodactylum tricornutum*)またはクリプトコジニウム属(*Cryptocodinium*)、繊毛虫綱(*Ciliata*)(スチロニキア属(*Stylonychia*)など)またはコルピディウム属(*Colpidium*)のような藻類、糸状菌モルティエレラ属(*Mortierella*)、疫病菌エントモフトラ属(*Entomophthora*)またはケカビ属(*Mucor*)のような真菌である。PUFAをはじめとする一連の望ましい化合物を産生する対象の微生物の突然変異株が、菌株選別によって数多く開発されてきた。しかし、ある種の分子の向上した生産を示す菌株の選択には時間と手間がかかる。さらに、特定の不飽和脂肪酸または特定スペクトルの脂肪酸は限られた微生物でしか産生され得ないという事実も不利である。

【0005】

代替法として、ファインケミカルは、植物(上記PUFAを産生するように開発されたもの)の栽培により大量に取得することができる。この目的に特によく適合する植物は、多量の脂質化合物を含有する油脂作物(oil crop)、例えば、アブラナ、キャノーラ、アマニ、ダイズ、ヒマワリ、ルリヂサ、マツヨイグサなどである。しかし、本発明の詳細な説明で述べるように、油または脂質と脂肪酸を含むその他の作物もよく適合する。通常の植物品種改良により、ある範囲の望ましい脂質と脂肪酸、または補因子と酵素を産生する一連の突然変異植物が開発されてきた。しかし、特定の分子の生産が向上している新規植物変種を選択するには時間と労力がかかり、そして高度不飽和 C_{20} -脂肪酸、 C_{22} -脂肪酸、またはより長い炭素鎖をもつ脂肪酸の場合のように、その化合物が対象の植物中にもともと存在しない場合には不可能でさえある。

【0006】

発明の概要

本発明は、PUFA生合成のエロンガーゼ遺伝子を同定・単離するのに適しており、かつ油、脂肪酸、脂質、脂質誘導化合物の改変（最も好ましくは、高度不飽和脂肪酸の生産）に使用することができる新規核酸分子を提供する。というのは、不飽和脂肪酸の生合成に関与し、しかもそれらの工業規模での生産を可能にする酵素をコードする新規遺伝子の必要性が依然として大きいからである。特に、高度不飽和脂肪酸（好ましくは、分子中に2個以上の二重結合があるもの）の伸長を可能にする脂肪酸生合成酵素が必要とされている。本発明による核酸は、かかる能力を備えた酵素をコードするものである。

【0007】

一般に、多数のファインケミカルの大規模製造のために工場で使用されるものは、ファエオダクチラム属(*Phaeodactylum*)、コルピディウム属(*Colpidium*)、モルティエレラ属(*Mortierella*)、エントモフトラ属(*Entomophthora*)、ケカビ属(*Mucor*)、クリプトコジニウム属(*Cryptocodinium*)、その他の藻類や真菌のような微生物、ならびに植物（特に油脂植物）である。

【0008】

クローニングベクターおよびクローニング技術が、WO 98/01572およびWO 00/23604に開示されるような上記微生物および繊毛虫綱(*Ciliata*)、またはFalcior eら, 1999, *Marine Biotechnology* 1(3):239-251; Dunahayら, 1995, *Genetic transformation of diatoms*, *J. Phycol.* 31:10004-1012 およびそこに引用される文献に記載される藻類および関連生物（例えば、*Phaeodactylum tricornutum*）に利用可能である以上、本発明による核酸分子をこれらの生物の組換え改変に使用して、それらを1種以上のファインケミカル（特に、不飽和脂肪酸）のより良好なまたはより効率的な生産体にすることができる。このファインケミカルの生産または生産効率の向上は、本発明遺伝子の操作の直接的結果により、またはこの操作の間接的結果によりもたらされる。

【0009】

コケ類と藻類は、相当量の高度不飽和脂肪酸、例えば、アラキドン酸（=ARA）、および／またはエイコサペンタエン酸（=EPA）、および／またはドコサヘ

キサエン酸 (=DHA) を産生する唯一知られた植物系である。コケ類は膜脂質中にPUFAを含有し、一方藻類、藻類に関連した生物、それに一部の真菌は、トリアシルグリセロール画分中に相当量のPUFAを蓄積する。したがって、トリアシルグリセロール画分中にPUFAを蓄積するこのような株から単離される核酸分子は、宿主、特に上記のような微生物、およびアブラナ、キャノーラ、アマニ、ダイズ、ヒマワリ、ルリヂサ、トウゴマ、ギネアアブラヤシ、ベニバナ (*Carthamus tinctorius*)、ココナツ、落花生、カカオマメといった油脂作物のような植物において、脂質およびPUFA産生系を改変するのに特に適している。さらに、トリアシルグリセロール蓄積微生物に由来する核酸は、PUFA前駆体分子の生合成を改変するのに適している他の生物種において、そのようなDNA配列および酵素を同定するために使用することができる。トリアシルグリセロール中にARA、EPA、DHAなどのPUFAを蓄積する微生物は、特に、海洋渦鞭毛藻 (*Cryptocodinium cohnii*) およびヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) のような微生物である。ヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytria*) は系統発生的にシゾキトリウム属 (*Schizochytria*) とも近縁である。これらの生物はツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*) のようなコケ類とは近縁でないにしても、異種ハイブリダイゼーション実験、配列アライメント、およびポリメラーゼ連鎖反応を用いた実験において、進化的には遠縁である生物からでも、DNA分子を同定し、単離し、機能的に特性決定できる程度に、DNAレベル、特にポリペプチドレベルでの配列類似性が認められる。特に、コンセンサス配列を誘導することができ、これらは異種スクリーニングまたは第三の生物種における遺伝子機能の機能的補完および予測に適している。したがって、これらの機能を同定できること、例えば、酵素の基質特異性を予測できることは非常に重要でありうる。さらに、これらの核酸分子は、関連ゲノムをマッピングするための、またはPCRプライマーを誘導するための基準配列としても役立つ。

【0010】

新規核酸分子は、本明細書中でPUFA特異的エロンガーゼ (=PSE) と呼ばれるタンパク質をコードしている。これらのPSEは、例えば、脂質またはPUFAのような脂肪酸の合成に必要とされる化合物の代謝 (例えば、生合成もしくは分解) に関係する機能、あるいは1種以上の脂質/脂肪酸組成物の細胞内または細胞外へ

の膜貫通輸送に関与する機能を発揮する。

【0011】

本出願では、かかる新規エロンガーゼ遺伝子の単離について詳細に開示する。本発明者らは、トリアシルグリセロール画分中に多量のPUFAを含有する典型的な生物から誘導している間に、長鎖の高度不飽和脂肪酸（好ましくは、脂肪酸の炭素骨格中に18または20個以上の炭素原子を有し、かつ／または炭素鎖中に少なくとも2個の二重結合を有するもの）を生産するのに適したエロンガーゼ遺伝子を初めて単離した。これは、単数では1つのPSE遺伝子もしくはPSEタンパク質を、そして複数では2つ以上のPSE遺伝子もしくはPSEタンパク質を意味する。他の公知の特許出願および刊行物は、機能的に活性なPSE遺伝子を開示も示唆もしていない。たとえ公知の特許出願がいくつかあるにしても、それらは短鎖または中等度鎖の飽和脂肪酸の伸長を示すものであるか（WO 98/46776およびUS 5,475,099）、あるいは、せいぜい1個の二重結合を有するかまたは長鎖脂肪酸ワックスエステルへ導く長鎖脂肪酸の伸長もしくは生産を示すものである（WO 98/54954、WO 96/13582、WO 95/15387を参照のこと）。本発明は、ここに、新規の特性を備えた新規エロンガーゼの単離を開示する。配列番号1に示した配列から出発して、不飽和脂肪酸を伸長させるエロンガーゼをコードする更なる核酸を探索することが可能である。

【0012】

WO 99/64616、WO 98/46763、WO 98/46764およびWO 98/46765は、トランスジェニック植物によるPUFAの生産を開示して、対応するデサチュラーゼ活性（特に、真菌由来）のクローニングおよび機能的発現を示しているが、PSEをコードする遺伝子も機能的PSE活性も示していない。デサチュラーゼ活性の発現により、トランスジェニック植物における脂肪酸スペクトルがシフトされるが、不飽和脂肪酸含量の増加は全く認められなかった。 C_{18} -炭素鎖をもつトリエン酸の生産が示されていて、 γ -リノレン酸に関して特許請求されているが、非常に長鎖の高度不飽和脂肪酸（ C_{20} -またはそれより長い炭素鎖を有し、トリエン酸またはそれより高い不飽和度の脂肪酸）の生産はこれまで実証されたことがない。

【0013】

長鎖PUFAを調製するには、高度不飽和 C_{16} -または C_{18} -脂肪酸をエロンガーゼの酵素活性により2炭素原子以上伸長させる必要がある。本発明による配列番号1に示した核酸配列は、脂肪酸中に少なくとも2個の二重結合がある C_{16} -または C_{18} -脂肪酸を2炭素原子以上伸長させることができる、最初の植物エロンガーゼをコードするものである。1回の伸長サイクル後、この酵素活性は C_{16} -脂肪酸をもたらす、2回、3回および4回の伸長サイクル後には、 C_{22} -、 C_{24} -または C_{26} -脂肪酸をもたらす。より長鎖のPUFAは、開示される他のエロンガーゼ（配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11）を用いても合成することができる。それらは、このPUFAの新規製造方法においてPUFA含量を高めるために単独でまたは複数で使用することができ、例えばヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）由来のPUFAエロンガーゼ（配列番号1）のほかに使用してもよい。本発明によるエロンガーゼの活性は、脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合がある（好ましくは、脂肪酸分子中に3個または4個の二重結合、特に好ましくは3個の二重結合がある） C_{16} -脂肪酸、および／または脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合がある（好ましくは、脂肪酸分子中に4個、5個または6個の二重結合、特に好ましくは5個または6個の二重結合がある） C_{22} -脂肪酸をもたらすものが好ましい。本発明の酵素による伸長反応を行った後、高度に脱飽和された脂肪酸を得るために更なる脱飽和ステップを実施してもよい。したがって、エロンガーゼ活性の産物および実施しうる更なる脱飽和の産物は、より高度に脱飽和されたPUFA類、例えば、ドコサジエン酸、アラキドン酸、 ω^6 -エイコサトリエンジホモ- γ -リノレン酸、エイコサペンタエン酸、 ω^3 -エイコサトリエン酸、 ω^3 -エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、またはドコサヘキサエン酸である。本発明による酵素活性の基質は、例えば、タキソール酸、7,10,13-ヘキサデカトリエン酸、6,9-オクタデカジエン酸、リノール酸、リノレン酸、 α -もしくは γ -リノレン酸、またはステアリドン酸であり、さらに、アラキドン酸、エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸である。好ましい基質はリノール酸、 γ -リノレン酸および／または α -リノレン酸であり、さらに、アラキドン酸、エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸である。アラキドン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエ

ン酸が特に好適である。脂肪酸中に少なくとも2個の二重結合がある C_{16} -または C_{18} -脂肪酸は、本発明の酵素活性により、遊離脂肪酸の形でまたはエステル（例えば、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質、ホスホグリセリド、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、またはトリアシルグリセロール）の形で伸長させることができる。ヒトの栄養にとって特に重要なものは共役リノール酸(conjugated linolic acid)「CLA」である。CLAは、特に $C18:2^{9\text{ cis}, 11\text{ trans}}$ またはその異性体である $C18:2^{10\text{ trans}, 12\text{ cis}}$ のような脂肪酸を意味すると理解すべきである。こうした脂肪酸は、体内に摂取された後、ヒト酵素系により脱飽和または伸長されて健康増進作用に貢献しうる。また、本発明によるエロンガーゼは、分子中に少なくとも2個の二重結合がある共役脂肪酸を伸長させることが可能で、そのような健康増進用脂肪酸をヒトの栄養のために利用可能とする。共役脂肪酸のその他の例としては、 α -パリナリン酸、エレオステアリン酸、カレンドリニン酸(calendulic acid)がある。

【0014】

植物およびその形質転換体において使用しうるクローニングベクター、例えば、Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), chapter 6/7, pp. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, Kung & R. Wu編, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jeness, Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, Kung & R. Wu編, Academic Press, 1993, 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) に発表または引用されているクローニングベクターが与えられれば、本発明の核酸を広範囲の植物の組換え改変のために使用して、それらの植物を、PUFAなどの1種以上の脂質誘導産物のより良好な、より効率的な、または改変された生産体とすることができる。こうしたPUFAなどの脂質誘導産物の改良された生産または生産効率はこの遺伝子操作の直接的結果または間接的結果によってもたらされる。

【0015】

本発明によるPSEタンパク質の改変が、その改変されたタンパク質のため、油

脂作物または微生物からのファインケミカルの収率、生産および／または生産効率に直接的に影響を及ぼしうる一連の作用機構が存在する。PSEタンパク質やPSE遺伝子の数または活性を増大させ、その結果として、より多量のこれらの化合物を新規に生産させることができるが、PSEタンパク質やPSE遺伝子の活性および生合成能は対象の遺伝子の導入前にはこれらの生物に備わっていない。また、種々の分岐配列、すなわち、DNA配列レベルで相違する配列をこの目的に使用することも有利である。

【0016】

1個または複数個のPSE遺伝子を生物または細胞に導入すると、最終産物へ向かう生合成の流れが増大するだけでなく、対応するトリアシルグリセロール組成物も増加するかまたは新規に合成される。同様に、1種以上のファインケミカル（例えば、脂肪酸、極性および中性脂質）の生合成に必要とされる栄養素の輸送に関与する他の遺伝子の数または活性を増大させ、その結果として、細胞または貯蔵コンパートメント内のこれらの前駆体、補因子または中間体の濃度を高めてもよく、こうして、以下で述べるように、細胞のPUFA産生能が増大する。ファインケミカルとしては脂肪酸と脂質それ自体が好ましいが、これらの化合物の生合成に関与する1種以上のPSEの活性を最適化したり、その数を増加させたり、あるいはこれらの化合物の分解に関与する1種以上のPSEの活性を破壊したりすることで、植物または微生物からの脂肪酸分子および脂質分子の収率、生産および／または生産効率を増加させることができる。

【0017】

さらに、本発明によるPSE遺伝子の突然変異誘発は、1種以上の望ましいファインケミカルの生産に直接または間接的に影響を及ぼす、改変された活性を示すPSEタンパク質をもたらす可能性がある。例えば、本発明によるPSE遺伝子の数または活性を増大させて、細胞の通常の代謝老廃物または副産物（目的のファインケミカルの過剰生産のため、その量が増加しうる）を、それらが細胞内で他の分子またはプロセスを破壊する（細胞の生存能を低下させる）前、あるいはファインケミカルの生合成経路を妨害する（それゆえに、目的のファインケミカルの収率、生産もしくは生産効率を低下させる）前に、効率的に排出するようにするこ

とができる。さらに、目的のファインケミカルそれ自体の比較的多い細胞内含量が細胞にとって毒性となることもあり、また、アロステリック調節のような酵素フィードバック機構を妨げることもある。例えば、それらは、PUFA経路の下流にある他の酵素または解毒酵素の増大した活性または数のため、トリアシルグリセロール画分へのPUFAの配分を増加させ、種子細胞の生存能を高め、ひいては培養下の細胞の良好な発達へ導くか、または目的のファインケミカルを産生する種子をもたらす。あるいはまた、種々の脂質分子および脂肪酸分子が対応する量で産生されるように、本発明によるPSE遺伝子を操作することができる。これは細胞膜の脂質組成に決定的な影響を及ぼし、新たに合成されたPUFAの存在に加えて新規な油をもたらす。それぞれのタイプの脂質は異なる物理的特性を示すので、膜の脂質組成の変化は膜の流動性を実質的に変更しうる。膜の流動性の変化は膜を経由する分子の輸送および細胞の完全性に影響を与え、これら双方ともファインケミカルの生産に決定的な影響を及ぼす。さらに、植物では、こうした変化が非生物学的および生物学的ストレス状況に対する耐性のような他の形質にも影響を及ぼすことがある。

【0018】

生物学的および非生物学的ストレス耐性は、様々な植物に付与することが望ましい一般的形質であり、そのような植物として、トウモロコシ、コムギ、ライムギ、オートムギ、ライコムギ、イネ、オオムギ、ダイズ、落花生、ワタ、アブラナおよびキャノーラ、キャッサバ、コショウ、ヒマワリおよびセンジュギク、ナス科植物（例：ジャガイモ、タバコ、ナス、トマト）、ソラマメ属(*Vicia species*)、エンドウ、アルファルファ、低木の植物（コーヒー、カカオ、チャ）、ヤナギ属(*Salix species*)、樹木（ギネアアブラヤシ、ココナツ）、多年生植物および家畜のかいば作物が挙げられる。本発明の別の実施形態として、これらの作物は遺伝子操作のための好適な標的植物でもある。本発明に従う特に好ましい植物は油脂作物であり、例えば、ダイズ、落花生、アブラナ、キャノーラ、ヒマワリ、サフラワー、樹木（ギネアアブラヤシ、ココナツ）、またはトウモロコシ、コムギ、ライムギ、オートムギ、ライコムギ、イネ、オオムギ、アルファルファ、低木の植物（コーヒー、カカオ、チャ）などの作物がある。

【0019】

したがって、本発明の一態様は、1種のPSEまたは数種のPSEまたはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列、あるいはPSEをコードする核酸（例えば、DNAまたはmRNA）を検出もしくは増幅するためのプライマーまたはハイブリダイゼーションプローブとして適する核酸断片を含む、単離された核酸分子（例えば、cDNA）に関する。特に好ましい実施形態では、核酸分子は配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示したヌクレオチド配列のうちの1つ、またはこれらのヌクレオチド配列の1つのコード領域もしくは相補体を含む。他の特に好ましい実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9もしくは配列番号11に示したヌクレオチド配列またはその一部とハイブリダイズするヌクレオチド配列、あるいは、これらに対して少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、80%または90%、より一層好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を有するヌクレオチド配列を含む。他の好ましい実施形態において、単離された核酸分子は配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12に示したアミノ酸配列のうちの1つをコードする。本発明の好適なPSE遺伝子は、本明細書に記載するPSE活性のうちの少なくとも1つをもつことが好ましい。

【0020】

別の実施形態において、単離された核酸分子はタンパク質またはその一部をコードし、該タンパク質またはその一部は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10もしくは配列番号12のアミノ酸配列に対して十分な相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつPSE活性を保持するものである。好ましくは、該核酸分子によりコードされるタンパク質またはその一部は、植物の細胞膜の合成に必要とされる化合物の代謝に関与するか、または細胞膜を介した分子の輸送に関与する能力を保持する。一つの実施形態において、該核酸分子によりコードされるタンパク質は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10もしくは配列番号12のアミノ酸配列に対して少なくとも約50%、好

ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、80%または90%、最も好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を有する。さらに好ましい実施形態においては、該タンパク質は完全長のタンパク質であり、その一部が配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10もしくは配列番号12の完全なアミノ酸配列（これは配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9もしくは配列番号11に示したオープンリーディングフレームによる）と実質的に相同であり、当業者には周知の方法および実験によりその完全長で単離し得るものである。

【0021】

別の好ましい実施形態において、単離された核酸分子は、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*) (ジャガイモの胴枯れ病菌)、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、海洋渦鞭毛藻 (*Cryptocodinium cohnii*)、またはヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) に由来するものであり、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10もしくは配列番号12のアミノ酸配列に対して少なくとも約50%またはそれ以上の相同性を有し、かつ植物の細胞膜の合成に必要とされる化合物の代謝またはこれらの膜を介した分子の輸送に関与する能力を保持するか、あるいはARA、EPA、DHAなどのPUFAまたはそれらの前駆体分子をもたらす伸長活性あるいは表1に示した活性の少なくとも1つを有する、生物学的に活性なドメインを含むタンパク質（例えば、PSE融合タンパク質）をコードする。該核酸分子は異種ポリペプチドまたは調節タンパク質をコードする異種核酸配列を含んでいてもよい。

【0022】

【表1】

5つのトランスジェニック酵母株の脂肪酸プロファイル(モル%)。添加されて取り込まれた γ -リノレン酸の割合は強調のため太字の数字で示され、伸長産物の割合には下線が引いてあり、伸長 γ -リノレン酸の割合は強調のため太字の数字で示される(最下行)。

脂肪酸 [mol%]	pYES2	pY2PSE1a	pY2PSE1b	pY2PSE1c	pY2PSE1d
16:0	17.0	17.6	16.4	16.3	17.6
16:1 Δ^9	28.0	26.8	28.0	27.9	25.1
18:0	6.5	6.0	6.4	5.6	6.1
18:1 Δ^9	25.9	23.5	27.0	25.2	21.4
18:3 $\Delta^{6,9,12}$	22.6	15.7	13.2	16.4	22.8
20:3 $\Delta^{8,11,14}$	-	10.3	9.0	8.6	7.1
18:3 $\Delta^{6,9,12}$ 伸長	-	39.6	40.5	34.4	23.7

【0023】

別の実施形態において、単離された核酸分子は、長さが少なくとも15ヌクレオチドであって、ストリンジェント条件下で配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9もしくは配列番号11のヌクレオチド配列からなる核酸分子とハイブリダイズするものである。単離された核酸分子は、好ましくは、天然に存在する核酸分子に相当する。より好ましくは、単離された核酸分子は、天然に存在するクリプテコジニウム属(*Cryptocodium*)、エキビョウキン属(*Phytophthora*)、もしくはヤブレッツボカビ属(*Thraustochytrium*)由来のPSE、またはその生物学的に活性な部分をコードする。

【0024】

本発明の別の態様は、少なくとも1つの本発明によるヌクレオチド分子を含むベクター(例えば、組換え発現ベクター)、ならびに、これらのベクターが導入されている宿主細胞、特に、微生物、植物細胞、植物組織、植物器官、または完全な植物体に関する。一つの実施形態において、そのような宿主細胞はファインケミカル(特に、PUFA)を蓄えることができ、所望の化合物を単離するために該細胞が回収される。その後、化合物(油、脂質、トリアシルグリセリド、脂肪酸)またはPSEが、培地からまたは宿主細胞(植物の場合には、ファインケミカル

を含有または貯蔵する細胞、最も好ましくは、種皮、塊茎などの貯蔵組織の細胞、表皮細胞および種子細胞) から単離され得る。

【0025】

本発明のさらに別の態様は、遺伝子改変植物、好ましくはPSE遺伝子が導入されている上記の油脂作物、特に好ましくはアブラナ、アマニ、またはヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) 植物に関する。一つの実施形態においては、アブラナ、アマニ、またはヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) のゲノムが、野生型または変異型PSE配列をコードする本発明の核酸分子をトランスジーンとして導入することにより、改変されている。別の実施形態においては、ドナー生物としてのヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*)、クリプテコジニウム属 (*Cryptocodinium*)、またはヤブレツボカビ属 (*Thraustochytrium*) のゲノム中の内在性PSE遺伝子が、例えば、改変型PSE遺伝子との相同的組換えにより、あるいはDNA配列を用いた突然変異誘発および検出により、改変されている (すなわち、機能的に破壊されている)。好ましい実施形態において、植物はツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、ヤノウエノアカゴケ属 (*Ceratodon*)、ヒョウタンゴケ属 (*Funaria*)、アブラナまたはアマニに属するものであるが、ツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、アブラナまたはアマニが好適である。好ましい実施形態では、ツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、アブラナまたはアマニを使って、脂質または脂肪酸 (PUFAが特に好適である) のような所望の化合物を生産する。

【0026】

さらに別の好ましい実施形態においては、コケであるヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) が本発明に記載の核酸に基づく相同的組換えを用いてエロンガーゼ遺伝子の機能を実証するために使用される。

【0027】

本発明のさらに別の態様は、単離されたPSE遺伝子またはその一部 (例えば、生物学的に活性な部分) に関する。好ましい実施形態では、単離されたPSEまたはその一部は、微生物もしくは植物細胞の細胞膜の合成に必要とされる化合物の代謝または細胞膜を介した分子の輸送に関与し得るものである。別の好ましい実

施形態では、単離されたPSEまたはその一部は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10もしくは配列番号12のアミノ酸配列に対して十分な相同性を有し、かつ、該タンパク質またはその一部は、微生物もしくは植物細胞の細胞膜の合成に必要とされる化合物の代謝または細胞膜を介した分子の輸送に関与する能力を保持するものである。

【0028】

本発明はまた、PSEの単離された調製物を提供する。好ましい実施形態において、PSE遺伝子は配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10もしくは配列番号12のアミノ酸配列を含む。さらに好ましい実施形態では、本発明は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10もしくは配列番号12の完全なアミノ酸配列（これは配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9もしくは配列番号11に示したオープンリーディングフレームによりコードされる）と実質的に相同である単離された完全長のタンパク質に関する。さらなる実施形態では、該タンパク質は配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10もしくは配列番号12のアミノ酸配列に対して少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、80%または90%、最も好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を有する。他の実施形態では、単離されたPSEは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12のアミノ酸配列のうちの1つに対して少なくとも約50%の相同性を有し、かつ微生物もしくは植物細胞中の脂肪酸の合成に必要とされる化合物の代謝または細胞膜を介した分子の輸送に関与するか、あるいは1以上のPUFA伸長活性を有する（該伸長は有利には少なくとも2つの位置に二重結合がある脱飽和 C_{16} -、 C_{18} -または C_{20} -炭素鎖に係わるものである）アミノ酸配列を含む。

【0029】

あるいはまた、単離されたPSEは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9もしくは配列番号11のヌクレオチド配列と、例えばストリンジェント条件下で、ハイブリダイズするか、またはこれに対して少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、80%ま

たは90%、最も好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を有するヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含むことができる。好ましいPSEはまた、本明細書に記載するPSE活性のうちの1つをもつことが好適である。

【0030】

PSEポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分は、非PSEポリペプチドと機能的に連結させて融合タンパク質を形成させることができる。好ましい実施形態では、この融合タンパク質はPSE単独の活性とは異なる活性を有する。他の好ましい実施形態では、この融合タンパク質は、微生物もしくは植物中の脂質と脂肪酸、補因子と酵素の合成に必要とされる化合物の代謝、または細胞膜を介した分子の輸送に関与する。特に好ましい実施形態では、宿主細胞へのこの融合タンパク質の導入が該細胞による所望の化合物の生産をモジュレートする。好ましい実施形態では、こうした融合タンパク質はまた、 $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 、 $\Delta 8$ 、 $\Delta 15$ 、 $\Delta 17$ 、または $\Delta 19$ -デサチュラーゼ活性を単独でまたは組合せて含む。

【0031】

本発明の別の態様は、ファインケミカルの生産方法に関する。この方法は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9もしくは配列番号11の本発明によるヌクレオチド配列、またはその相同体、誘導体もしくは類似体、あるいは配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9もしくは配列番号11、またはその相同体、誘導体もしくは類似体を含む遺伝子構築物、あるいは該配列もしくは遺伝子構築物を含み、ファインケミカルが産生されるように本発明のPSE核酸分子の発現をもたらすベクター、を含有する適当な微生物、または植物細胞、植物組織、植物器官もしくは完全な植物体を培養することを含んでなる。好ましい実施形態において、この方法はさらに、本発明のPSE核酸の発現をもたらすエロンガーゼ核酸配列、遺伝子構築物またはベクターを用いて細胞を形質転換することにより、そのようなエロンガーゼ核酸配列を含む細胞を取得するステップを含む。さらに好ましい実施形態では、この方法はさらに、培養物からファインケミカルを取得するステップを含む。特に好ましい実施形態では、該細胞は、繊毛虫綱(Ciliata)、真菌のような微生物、または植物界(特

に油脂作物)に属するものであり、微生物または油脂作物が特に好ましい。

【0032】

本発明の別の態様は、微生物による分子の生産をモジュレートする方法に関する。この方法は、細胞に、PSE活性またはPSE核酸の発現をモジュレートする物質を接触させて、細胞に関連した活性が該物質の非存在下での該活性と比較して改変されるようにすることを含んでなる。好ましい実施形態では、脂質と脂肪酸、補因子と酵素のための細胞の1もしくは2代謝経路、または細胞膜を介した化合物の輸送は、該微生物による所望のファインケミカルの生産高または生産率が向上するようにモジュレートされる。PSE活性をモジュレートする物質は、PSE活性またはPSE核酸の発現を刺激する物質、あるいは脂肪酸生合成における中間体として使用できる物質であり得る。PSE活性またはPSE核酸の発現を刺激する物質の例としては、とりわけ、小分子、活性PSEおよび細胞に導入されているPSEをコードする核酸がある。PSE活性またはPSE発現を阻害する物質の例としては、とりわけ、小分子および／またはアンチセンスPSE核酸分子がある。

【0033】

本発明のさらなる態様は、細胞からの所望の化合物の生産高をモジュレートする方法に関し、この方法は、細胞に野生型または変異型PSE遺伝子(別個のプラスミド上に保持されるか、宿主細胞のゲノムに組み込まれる)を導入することを含んでなる。ゲノムへの組込みの場合には、その組込みは、ランダムであってもよいし、天然の遺伝子を導入用のコピーで置き換えて該細胞による所望の化合物の生産をモジュレートするような方法で組換えにより行ってもよいし、あるいは、遺伝子が機能的な発現単位(遺伝子の発現を確実にする少なくとも1つの配列と、機能的に転写された遺伝子のポリアダニル化を確実にする少なくとも1つの配列とを含む)に機能的に連結されるように遺伝子イントロンを用いることにより行ってもよい。

【0034】

好ましい実施形態においては、生産高(収率)が改変される。さらなる実施形態では、所望のファインケミカルが増加する。また、マイナスの影響を及ぼす望ましくない化合物を減少させることも可能である。特に好ましい実施形態では、

所望のファインケミカルは脂質または脂肪酸、補因子または酵素である。特に好ましい実施形態では、このファインケミカルは高度不飽和脂肪酸である。より好ましくは、アラキドン酸 (=ARA)、エイコサペンタエン酸 (=EPA)、またはドコサヘキサエン酸 (=DHA) から選択される。

【0035】

本発明の詳細な説明

本発明は、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*)、クリプテコジニウム属 (*Crypthecodinium*) またはヤブレッツボカビ属 (*Traustochytrium*) における脂質と脂肪酸、PUFA補因子および酵素の代謝、あるいは、膜を介した親油性化合物の輸送に間よするPSE核酸およびPSEタンパク質分子を提供する。本発明に従う化合物は、生物、例えば、繊毛虫、真菌、酵母、細菌、藻類などの微生物、および／またはトウモロコシ、コムギ、ライムギ、オートムギ、ライコムギ、イネ、オオムギ、ダイズ、落花生、ワタ、アブラナ、キャノーラおよびカブのようなアブラナ属の種、コショウ、ヒマワリ、ルリヂサ、マツヨイグサおよびマンジュギク、ジャガイモ、タバコ、ナスおよびトマトのようなナス科の植物、ソラマメ属の種、エンドウ、タピオカ、ムラサキウマゴヤシ、低木植物 (コーヒー、カカオ、チャ)、ヤナギ属の種、樹木 (ギネアアブラヤシ、ココナツ) ならびに、多年生草および飼料穀物などの植物に由来するファインケミカルの生産を直接修飾する (例えば、脂肪酸合成タンパク質の過剰発現または最適化が、改変された生物由来の脂肪酸の収率、生産および／または生産効率に直接影響を及ぼす場合) か、あるいは、間接的に影響を及ぼすこともでき、間接的影響によっても、所望の化合物の収率、生産および／または生産効率を高めたり、不要な化合物を減少させたりすることができる (例えば、脂質と脂肪酸、補因子と酵素の代謝のモジュレーションによって、細胞内の所望化合物の収率、生産および／または生産効率を改変するか、もしくはその組成を改変して、これにより、1種以上のファインケミカルの生産に影響を与える場合)。以下に本発明の態様について、さらに詳しく説明する。

【0036】

I. ファインケミカルおよびPUFA

「ファインケミカル」という用語は、当業者には公知であり、生物によって生産された分子であって、例えば、限定するものではないが、製薬業、農工業、食品および化粧品産業などの様々な産業界で用いられている分子を包含する。これらの化合物は、脂質、脂肪酸、補因子および酵素など（例えば、*Biotechnology* 第6巻、Rehmら編：VCH Weinheim 中のKuninaka, A. (1996) *Nucleotides and related compounds*, pp. 561-612、およびそこに引用された参考文献に記載されている）、脂質、飽和および不飽和脂肪酸（例えば、アラキドン酸）、ビタミンおよび補因子（*Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. A27, *Vitamins*, pp. 443-613 (1996) : VCH Weinheimおよびそこに引用された参考文献；ならびに、Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) *Nutrition, Lipids, Health and Disease Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asia*, 1994年9月1～3日、マレーシア、ペナンで開催、AOCS Press (1995)）、ならびに、Gutcho (1983) により、*Chemicals by Fermentation*, Noyes Data Corporation, ISBN : 0818805086およびそこに引用された参考文献に記載された酵素およびその他のあらゆる化学物質を包含する。特定のファインケミカルの代謝および使用について、以下にさらに詳しく説明する。

【0037】

各種前駆体分子と生合成酵素との組合せにより、膜組成に決定的な影響を与える様々な脂肪酸分子が生産される。PUFAは、トリアシルグリセロールだけではなく、膜脂質にも組み込まれると想定することができる。

【0038】

膜合成は、二分子膜の一部として、脂質を含む多数の構成要素が関与する、十分に特性化がなされた工程である。従って、PUFAのような新規の脂肪酸の生産により、細胞または生物内に膜機能の新たな特性を生み出すことができる。

【0039】

細胞膜は、細胞において非常に多数の機能を果たしている。最も重要なのは、膜が、環境から細胞の内容物の境界を定め、これによって、細胞に一体性を賦与することである。膜はまた、有害または不要な化合物の流入に対する、あるいは

、所望の化合物の流出に対する障壁としての役割も果たしている。

【0040】

膜の関与、および関連する機構についてさらに詳しくは、下記を参照にされたい：Bamberg, E.ら (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes, *Q. Rev. Biophys.* 26:1-25; Gennis, R.B. (1989) Pores, Channels and Transporters, in: *Biomembranes, Molecular Structure and Function*, Springer: Heidelberg, pp. 270-322; およびNikaido, H.およびSaier, H. (1992) Transport proteins in bacteria: common themes in their design, *Science* 258:936-942、ならびに、これら参考文献に含まれる引用文献。

【0041】

脂質合成は、2つの部分、すなわち、脂肪酸の合成およびそれらのsn-グリセロール-3-リン酸への結合と、極性頭部基 (head group) の付加または修飾とに分けることができる。膜に用いられる通常の脂質としては、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ質およびホスホグリセリドが挙げられる。脂肪酸合成は、アセチル-CoAの、アセチル-CoAカルボキシラーゼによるマロニル-CoAへの変換、もしくはアセチルトランスアシラーゼによるアセチル-ACPへの変換のいずれかで開始する。縮合反応の後、これら2つの生成物分子が一緒になって、アセトアセチル-ACPを形成し、これを縮合、還元および脱水の連続的反応により変換することによって、所望の鎖長を有する飽和脂肪酸分子が得られる。これら分子からの不飽和脂肪酸の生産は、分子状酸素を用いて好氣的に、あるいは、嫌氣的に、のいずれかで、特定のデサチュラーゼにより触媒される (微生物における脂肪酸合成については、F.C. Neidhardtら (1996) *E. coli and Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., pp. 612-636、およびそこに含まれる参考文献; Lengelerら (編) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme:Stuttgart, New York、およびそこに含まれる参考文献、ならびに、Magnuson, K.ら (1993) *Microbiological Reviews* 57:522-542、およびそこに含まれる文献を参照されたい)。

【0042】

PUFA生合成用の前駆体の例として、リノール酸およびリノレン酸がある。これらの C_{18} -炭素脂肪酸は、エイコサ鎖およびドコサ鎖タイプの脂肪酸を得るために

、 C_{10} または C_{12} まで伸長させなければならない。 Δ^6 -デサチュラーゼ、 Δ^5 -および Δ^4 -デサチュラーゼ活性を有する酵素などの様々なデサチュラーゼにより、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸、ならびに、その他の各種長鎖PUFAを得ることができ、これらは、抽出した後、食物および飼料、化粧品または医薬品用途の多様な目的に用いることができる。

【0043】

長鎖PUFAを生産するためには、高度不飽和 C_{16} -または C_{18} -または C_{20} -脂肪酸を前述のように、エロンガーゼの酵素活性により、2炭素原子以上伸長させなければならない。本発明に従う核酸配列は、トリアシルグリセロール画分にPUFAを含む典型的な生産体（プロデューサー）由来の最初の微生物エロンガーゼをコードし、このエロンガーゼは、脂肪酸中に少なくとも2個の二重結合がある C_{16} -または C_{18} -または C_{20} -脂肪酸を2炭素原子以上伸長させることができ、あるいは、例えば連続して、 C_{16} -または C_{18} -脂肪酸を C_{20} -脂肪酸に変換した後、 C_{20} -脂肪酸を、2C原子の単位を含む C_{22} -またはそれ以上の偶数脂肪酸に変換することができる。1回の伸長サイクル後、この酵素活性により、 C_{20} -脂肪酸が得られ、2、3および4回の伸長サイクル後に、 C_{22} -、 C_{24} -または C_{26} -脂肪酸が得られる。また、本発明に従うエロンガーゼを用いて、さらに長いPUFAを合成することもできる。好ましくは、本発明に従うエロンガーゼの活性により、脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合がある C_{20} -および/または C_{22} -脂肪酸、脂肪酸分子中に好ましくは3、4、5または6個の二重結合、特に好ましくは3個の二重結合がある C_{20} -脂肪酸、脂肪酸分子中に好ましくは3、4、5または6個の二重結合、特に好ましくは5または6個の二重結合がある C_{22} -脂肪酸が得られる。本発明に従う酵素を用いて伸長した後、さらに脱飽和工程を実施してもよい。従って、エロンガーゼ活性およびさらなる脱飽和の産物は、ドコサヘキサエン酸、アラキドン酸、 ω^6 -エイコサトリエンジホモ- γ -リノレン酸、エイコサペンタエン酸、 ω^3 -エイコサトリエン酸、 ω^3 -エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸またはドコサヘキサエン酸など、不飽和度の高い好ましいPUFAをもたらす。本発明に従うこの酵素の基質の例として、タキソール酸(taxol acid)、7,10,13-ヘキサデカトリエン酸、6,9-オクタデカジエン酸、リノール酸、 γ -リノレン酸、リノレン酸

、 α -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸またはステアリドン酸が挙げられる。好ましい基質として、リノール酸、 γ -リノレン酸および/または α -リノレン酸もしくはアラキドン酸、エイコサテトラエン酸またはエイコサペンタエン酸が挙げられる。脂肪酸中に少なくとも2個の二重結合がある C_{16} -または C_{18} -または C_{20} -脂肪酸は、本発明に従う酵素活性により、遊離脂肪酸の形で、あるいは、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質、ホスホグリセリド、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロールまたはトリアシルグリセロールなどのエステルで伸長させることができる。

【0044】

さらに、脂肪酸は、様々な位置に輸送された後、トリアシルグリセロール貯蔵脂質に組み込まねばならない。脂質合成におけるもう1つの重要な段階は、例えば、グリセロール脂肪酸アシルトランスフェラーゼによる、極性頭部基への脂肪酸の転移である (Frentzen, 1998, *Lipid*, 100 (4-5) :161-166を参照)。

【0045】

植物の脂肪酸生合成、脱飽和、脂質代謝および脂肪化合物の膜輸送、 β 酸化、脂肪酸修飾および補因子、トリアシルグリセロール貯蔵およびアセンブリについての出版物(そこで引用される参考文献も含む)については、次の論文を参照されたい: Kinney, 1997, *Genetic Engineering*, JK Setlow編, 19:149-166; OhlroggeおよびBrowse, 1995, *Plant Cell* 7:957-970; ShanklinおよびCahoon, 1998, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:611-641; Voelker, 1996, *Genetic Engineering*, JK Setlow編, 18:111-113; Gerhardt, 1992, *Prog. Lipid R.* 31:397-417; Guhnmann-Schafer & Kindl. 1995, *Biochim. Biophys Acta* 1256:181-186; Kunauら、1995、*Prog. Lipid Res.* 34:267-342; Stymneら、1993, *Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*, MurataおよびSomerville編, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, *Plant Journal*. 13(1):1-16。

【0046】

ビタミンや、補因子および「機能性食品」(nutraceuticals)、例えばPUFAは、細菌など、高等動物以外の生物により容易に合成される分子群であるが、高等

動物はもはや合成することができないため、摂取しなければならない分子群、あるいは、高等動物がそれ自身で十分な程度までもはや合成することができないため、補助的に摂取しなければならない分子群を意味する。これら分子を生産することができる生物（例えば、細菌など）における上記分子の生合成については、多かれ少なかれ特性づけられている（Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Vol. A27, pp. 443-613, VCH Weinheim, 1996; Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research Asia, 1994年9月1～3日に、マレーシア、ペナンで開催、AOCs Press, Champaign, IL X, 374 pp)。

【0047】

前記分子は、それ自体が生物活性分子であるか、あるいは、多数の代謝経路における電子担体または中間体のいずれかとして作用する生物活性物質の前駆体である。上記化合物は、その栄養的価値以外にも、着色剤、酸化防止剤および触媒もしくはその他の処理加工用補助剤として重要な工業的価値を有する（上記化合物の構造、活性および工業用途についての詳細は、例えば、Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Vol. A27, pp. 443-613, VCH Weinheim, 1996を参照のこと）。高度不飽和脂肪酸は、例えば、冠動脈性心疾患、炎症機構、小児の栄養などの場合に、様々な機能および健康促進効果を有する。出版物および参考文献（そこに引用されている文献を含む）については、下記を参照されたい：Simopoulos, 1999, Am. J. Clin. Nutr. 70 (3rd Suppl.) :560-569, Takahataら、Biosci. Biotechnol. Biochem, 1998, 62 (11) :2079-2085, WillichおよびWinther, 1995, Deutsche Medizinische Wochenschrift 120 (7) :229以下参照。

【0048】

II. 本発明のエレメントおよび方法

本発明は、少なくとも部分的に、本明細書でPSE核酸およびPSEタンパク質分子

と称する新しい分子の発見に基づくものであり、該分子は、ヒメツリガネゴケ(*Phycomitrella patens*)、海洋渦鞭毛藻(*Cryptocodinium cohnii*)、フィトフトラ・インフェスタンス(*Phytophthora infestans*)、ヤブレッツボカビ属(*Thraustochytrium*)および／またはヤノウエノアカゴケ(*Ceratodon purpureus*)における細胞膜の生産に影響を及ぼし、例えば、これらの膜を介した分子の移動に影響を与える。一実施形態では、PSE分子は、微生物および植物などの生物における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝に関与したり、あるいは、これら膜を介した分子の輸送に間接的に影響したりする。好ましい実施形態では、膜成分の生産および膜輸送を調節する、本発明に従うPSE分子の活性は、この生物による所望のファインケミカルの生産に影響を与える。特に好ましい実施形態では、本発明に従うPSE分子の活性をモジュレートすることにより、本発明のPSEを調節する微生物または植物の代謝経路の収率、生産および／または生産効率が、モジュレートされ、膜を介した化合物の輸送効率が修飾され、これによって、微生物および植物による所望のファインケミカルの収率、生産および／または生産効率を直接的または間接的のいずれかでモジュレートするようにする。

【0049】

PSEまたはPSEポリペプチドという用語は、微生物および植物などの生物における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、またはこれらの膜を介した分子の輸送に関与するタンパク質を意味する。PSEの例として、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示したものの、あるいは、その相同体、誘導体もしくは類似体が挙げられる。PSEまたはPSE核酸配列という用語は、PSEをコードする核酸配列を含み、その一部は、コード領域と、さらに対応する5' -および3' -非翻訳配列領域であってもよい。PSE遺伝子の例として、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示した配列が挙げられる。生産および生産性という用語は、当業者には公知であり、所定期間内に、所定発酵容量において形成される発酵産物（例えば、所望のファインケミカル）の濃度（例えば、産物のkg/時/リットル）を包含する。生産効率という用語は、特定の生産量を達成するのに要する時間（例えば、細胞が、ファインケミカルの特定の処理量確立するのに要する時間）を意味

する。収率または製品／炭素収率という用語は、当業者には公知であり、炭素源が製品（すなわち、ファインケミカル）に変換される効率を意味する。これは、通常、炭素源 1 kg 当たりの製品の kg 数として表される。化合物の収率または生産が増加すると、得られる分子、すなわち、一定期間にわたる特定量の培養物において得られる上記化合物の好適な分子の量が増加する。生合成または生合成経路という用語は、当業者には公知であり、例えば、強度の調節を受ける多段階工程における、中間体からの細胞による、化合物、好ましくは、有機化合物の合成を意味する。異化作用もしくは異化作用経路という用語は、当業者には公知であり、例えば、強度の調節を受ける多段階工程において、細胞による、異化代謝産物（一般には、さらに小さいまたは少ない複合体分子）への、化合物、好ましくは、有機化合物の切断を意味する。代謝という用語は、当業者には公知であり、生物において起こる生化学反応のすべてを包含する。特定の化合物の代謝（例えば、脂肪酸の代謝）は、従って、この化合物に関連する、細胞内での該化合物の生合成、修飾および異化経路のすべてを包含する。

【0050】

別の実施形態では、本発明に従う PSE 分子は、微生物または植物におけるファインケミカルのような所望の分子の生産をモジュレートすることができる。本発明の PSE の修飾によって、この修飾タンパク質を含む微生物株または植物株からのファインケミカルの収率、生産および／または生産効率に直接影響を与える一連の作用機構が存在する。細胞内で、または細胞からの、ファインケミカルの分子の輸送に関与する PSE の数または活性を増加させることにより、膜を介して輸送される上記化合物の量を増加させ、これから、該化合物を容易に取得および相互に変換することができる。さらに、脂肪酸、トリアシルグリセロールおよび／または脂質は、それ自体が所望のファインケミカルであり、これら化合物の生合成に関与する本発明の 1 種以上の PSE の活性を最適化する、もしくはその数を増加する、あるいは、上記化合物の異化作用に関与する 1 種以上の PSE の活性を妨害することにより、微生物または植物などの生物からの脂肪酸分子および脂質分子の収率、生産および／または生産効率を高めることができる。

【0051】

本発明に従うPSE遺伝子の突然変異誘発によって、活性が改変されたPSEを生じさせることができ、この改変された活性は、微生物または植物からの1種以上の所望のファインケミカルの生産に間接的に影響する。例えば、廃棄物の輸送に関与する本発明のPSEは、これまでより数が多い、もしくは活性が高いため、細胞の正常代謝廃棄物（その量は、所望のファインケミカルの過剰生産により増加する恐れがある）が、細胞内の分子を損なう（これにより、細胞の生存能力が低下する）、あるいは、ファインケミカルの生合成経路を妨害する（これにより、所望のファインケミカルの収率、生産または生産効率を低下させる）前に、該廃棄物を効率的に輸送することができる。所望のファインケミカル自体の細胞内量が比較的多い場合には、細胞にさらに有毒となる恐れがあるため、上記化合物を細胞から送り出すことができる輸送体の活性または数の増加によって、培養物中の細胞の生存能力を高め、ひいては、所望のファインケミカルを生産する培養物中の細胞数を増加させる。また、本発明のPSEを操作して、対応する量の様々な脂質分子および脂肪酸分子を生産することも可能である。これは、細胞膜の脂質組成に実質的な影響を与える。脂質は、種類によって、異なる物理的特性を有することから、膜の脂質組成の改変により、膜の流動性を有意に改変することができる。膜流動性の改変により、膜を介した分子の輸送および細胞の完全性に影響を与えることができ、それらの各々が、大規模発酵培養における微生物および植物からのファインケミカルの生産に実質的な影響を及ぼす。植物の膜は、高温および低温、塩分、渇水に対する耐性、ならびに、細菌や真菌のような病原体に対する耐性などの特定の特性を賦与する。従って、膜成分のモジュレーションは、植物が、前述のストレスパラメーターの下で生存する能力に決定的な影響を与え得る。これは、シグナルカスケードの変化を介して、または、改変された膜組成（例えば、Chapman, 1998, Trends in Plant Science, 3(11):419-426を参照）およびシグナルカスケード（Wang 1999, Plant Physiology, 120:645-651を参照）を介して直接起こるか、あるいは、WO 95/18222に開示されているように、低温の耐性に影響を与え得る。

【0052】

本発明の単離された核酸配列は、例えば、American Type Culture Collection

(ATCC) から株番号ATCC26185 (ヤブレッツボカビ属(*Thraustochytrium*))で入手可能なヤブレッツボカビ属の系統のゲノム、あるいは、クリプテコジニウム属(*Crypthecodinium*)の場合には、例えば、Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) West Boothbay Harbour、米国メイン州) から株培養物番号CCMP316で入手可能なクリプテコジニウム属の系統のゲノムに存在する。フィトフトラ・インフェスタンス(*Phytophthora infestans*)の場合には、前記核酸分子は、系統ATCC 48886から単離される。

【0053】

単離されたツリガネゴケ属(*Physcomitrella*)、クリプテコジニウム属(*Crypthecodinium*)、フィトフトラ・インフェスタンス(*Phytophthora infestans*)またはヤブレッツボカビ属(*Thraustochytrium*)のcDNAのヌクレオチド配列、ならびに、ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*) PSEの推定アミノ酸配列を配列番号1～配列番号12に示す。コンピュータ解析を実施することにより、これらのヌクレオチド配列を、細胞膜成分の代謝に関与するタンパク質をコードする配列、または細胞膜を介した化合物の輸送、もしくはPUFA生合成に関与する配列として分類および／または同定した。本発明者のデータベースにおけるデータベース入力番号PP001019019F、CC001042041R、PI001002014R、TC002034029R、TC002034029R-11およびTC002014093Rを有するESTは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示した本発明の配列を構成する。同様に、部分的ポリペプチドは、PP001019019F、CC001042041R、PI001002014R、TC002034029R、TC002034029R-11およびTC002014093Rと称され、表2に従い、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12に示した本発明の配列を構成する。EST TC002034029Rの完全な断片挿入物を配列決定したところ、配列番号3が得られ、これは、TC002034029Rの完全な配列であった。TC002034029R-11は、ヤブレッツボカビ属(*Thraustochytrium*)からのエロンガーゼの全長配列を表す。残りのクローンの名称も同様に付けられている。また、対応する遺伝子名を様々なクローンに割り当てた。略語：Tc=ヤブレッツボカビ属(*Thraustochytrium*)、Cc=クリプテコジニウム属(*Crypthecodinium*)、Pp=ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)、P=フィトフトラ・インフェスタンス(*Phy*

tophthora infestans)。

【0054】

【表2】

名称／EST名	遺伝子名	ポリペプチド 配列番号	核酸配列番号
PP001019019F	Pp_PSE1	2	1
TC002034029R	Tc_PSE1	4	3
TC002014093R	Tc_PSE2	6	5
CC001042041R	Cc_PSE1	8	7
TC002034029R-11	Tc_PSE1_1	10	9
PI001002014R	Pi_PSE1	12	11

【0055】

本発明はまた、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12のアミノ酸配列と本質的に相同のアミノ酸配列を有するタンパク質に関する。本明細書で用いる「選択されたアミノ酸配列と本質的に相同のアミノ酸配列を有するタンパク質」は、選択されたアミノ酸配列、例えば、選択された完全アミノ酸配列と少なくとも約50%の相同性を有する。また、選択されたアミノ酸配列と本質的に相同のアミノ酸配列を有するタンパク質は、選択されたアミノ酸配列と少なくとも約50～60%、好ましくは、少なくとも約60～70%、さらに好ましくは、少なくとも約70～80%、80～90%または90～95%、ならびに、最も好ましくは、少なくとも96%、97%、98%、99%以上の相同性を有するものでよい。

【0056】

本発明のPSE、またはそれらの生物学的に活性な部分もしくは断片は、微生物または植物における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、もしくはこれらの膜を介した分子の輸送に関与することができるか、あるいは、 C_{16} -または C_{18} -または C_{20} -PUFAの伸長に要する1種以上の活性を有するため、 C_{20} -または C_{22} -または C_{24} -PUFAおよび近縁のPUFAが得られる。

【0057】

本発明の様々な実施形態について以下でさらに詳しく説明する。

【0058】

A. 単離された核酸分子

本発明の一実施形態は、PUFA産生微生物から誘導され、脂肪酸中に少なくとも2個の二重結合がある C_{16} -または C_{18} -脂肪酸を2炭素原子以上伸長させるか、あるいは、脂肪酸中に少なくとも2個の二重結合がある C_{20} -脂肪酸を2炭素原子以上伸長させる、ポリペプチドをコードする単離された核酸を含んでなる。

【0059】

本発明のさらに別の実施形態は、脂肪酸中に少なくとも2個の二重結合がある C_{16} -、 C_{18} -または C_{20} -脂肪酸を2炭素原子以上伸長させるヌクレオチド配列であって、

- a) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示した核酸配列、
 - b) 遺伝子コードの縮重に従って、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示した配列の1つから誘導される核酸配列、または、
 - c) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12に示したアミノ酸配列のポリペプチドをコードする配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示した配列の誘導体であって、該ポリペプチドの酵素作用を実質的に低下させることなく、アミノ酸レベルで少なくとも約50%の相同性を有する該誘導体、
- からなる群より選択される、上記核酸を含んでなる。

【0060】

C_{16} -、 C_{18} -または C_{20} -エロンガーゼとして作用する本発明に従う前記核酸は、PUFAを合成することができる繊毛虫、真菌、藻類、植物または渦（双）鞭毛虫のような生物、好ましくは、植物または藻類、特に好ましくは、エキビヨウキン属 (*Phytophthora*)、ツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、クリプトコジニウム属 (*Cryptocodinium*)、ヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) またはシゾキトリウム属 (*Schizochytrium*)、最も好ましくは、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*)、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、海洋渦鞭毛藻 (*Cryptocodinium cohnii*) もしくはヤブレッツボカビ属 sp.、シゾキトリウム属

sp.、あるいは近縁の生物から誘導される。

【0061】

本発明の一実施形態は、PSEポリペプチドもしくはその生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子、ならびに、PSEコード核酸（例えば、PSE DNA）を同定または増幅するハイブリダイゼーションプローブまたはプライマーとして使用するのに十分な核酸断片に関連する。本明細書で用いられる用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）およびRNA分子（例えば、mRNA）、ならびに、ヌクレオチド類似体により作製されるDNAまたはRNA類似体を包含するものとする。この用語はさらに、コード遺伝子領域の3' および5' 末端での非翻訳配列、すなわち、コード領域の5' 末端の上流にある少なくとも約100ヌクレオチドの配列と、コード遺伝子領域の3' 末端の下流にある少なくとも約20ヌクレオチドの配列とを包含する。核酸分子は、一本鎖または二本鎖のいずれでもよいが、好ましくは、二本鎖DNAである。「単離された」核酸分子とは、天然の核酸源に存在するその他の核酸分子から分離されたものである。「単離された」核酸分子は、好ましくは、この核酸が誘導される生物のゲノムDNA内で、該核酸と本来隣接する配列（例えば、該核酸の5' および3' 末端に位置する配列）を一切持っていない。様々な実施形態では、単離されたPSE核酸分子は、例えば、核酸が誘導される細胞（例えば、ヒメツリガネゴケ細胞）のゲノムDNA内で本来隣接する、例えば、約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kbまたは0.1 kbより小さいヌクレオチド配列を含んでいてもよい。cDNAのような「単離された」核酸分子は、それが、組換え法により産生された場合には、他の細胞材料もしくは培地をほとんど含まないか、あるいは、それが化学的に合成されたものであれば、化学的前駆体もしくはその他の化学物質を含まないと考えられる。

【0062】

本発明に従う核酸分子、例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9 および配列番号11のヌクレオチド配列もしくはその部分を含む核酸配列は、分子生物学の標準的技法、ならびに、本明細書に記載する配列情報を用いて、単離することができる。また、例えば、相同配列、またはDNAもしくはアミノ酸レベルで保存された相同配列も、アラインメントアルゴリズムを用

いて同定することができる。例えば、Phytophthora、Physcomitrella、CryptocodiniumまたはThraustochytrium cDNAは、完全な配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および／または配列番号11もしくはそれらの一部分をハイブリダイゼーションプローブとして用い、標準的ハイブリダイゼーション技法（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されているものなど）により、Phytophthora、Physcomitrella、CryptocodiniumまたはThraustochytriumライブラリーから単離することができる。さらに、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および／または配列番号11の完全配列もしくはそれらの一部分を包含する核酸分子は、ポリメラーゼ連鎖反応により単離することができ、その際、この配列またはその一部分、特に、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12のヒスチジンボックス (His-box) モチーフ周辺の領域、もしくは個々の既定アミノ酸中の同一物の修飾体に基づき作製したオリゴヌクレオチドプライマーを用いる（例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の完全配列もしくはそれらの一部分を包含する核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の同じ配列に基づいて作製しておいたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応により単離することができる）。さらに、図10に示すように、上記配列の部分配列はこの目的に特に適している。例えば、mRNAは細胞から単離することができ（例えば、Chirgwinら (1979) Biochemistry 18: 5294-5299によるグアニジウムチオシアネート抽出法による）、また、cDNAは逆転写酵素（例えば、メリーランド州ベセスダのGibco/BRLから入手可能なモロニーMLV逆転写酵素、フロリダ州セントピーターズバーグのSeikagaku America, Inc.から入手可能なAMV逆転写酵素）を用いて作製することができる。ポリメラーゼ連鎖反応を用いた増幅用の合成オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号1、3、5、7、9または11に示したヌクレオチド配列の1つに基づき、あるいは、図10に示したアミノ酸配列を用いて、作製することができる。本発明の核酸は、標準的PCR増幅法に従い、cDNAを用いて、あるい

は、鋳型としてのゲノムDNAおよび適当なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、増幅することができる。このようにして増幅した核酸は、適当なベクターにクローニングした後、DNA配列分析により特性決定することができる。PSEヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、例えば、自動DNA合成装置を用いて、標準的合成方法により作製することができる。

【0063】

配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11示した配列cDNAは、PSE（すなわち、「コード領域」）をコードする配列、さらには、5' -非翻訳配列および3' -非翻訳配列をコードする配列を包含する。この他にも、上記核酸は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示したうちの1配列のコード領域を包含する場合もあるし、あるいは、ゲノムDNAから単離した完全なゲノム断片を含む場合もある。

【0064】

なお、相関関係を容易にするため、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11と同じEST入力番号コードによって識別される。

【0065】

さらに好ましい実施形態では、本発明に従う単離された核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示すヌクレオチド配列のうち1配列の相補体である核酸分子、またはその一部分を包含する。配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示すヌクレオチド配列の1つに相補的な核酸は、それが、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示した配列番号の1つとハイブリダイズして、安定な二本鎖を作ることができれば、十分に相補的である。

【0066】

配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号

号11の配列を有する新規エロンガーゼ核酸配列の相同体とは、例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示したヌクレオチド配列の1つと、少なくとも約50~60%、好ましくは約60~70%、さらに好ましくは少なくとも約70~80%、約80~90%または90~95%、またさらに好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%以上の相同性を有する対立遺伝子変異体、あるいは、その相同体、誘導体または類似体もしくは一部分を意味する。さらに好ましい実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、ストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示すヌクレオチド配列もしくはその一部分の1つとハイブリダイズするヌクレオチド配列を包含する。対立遺伝子変異体は、特に、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示した配列からおよび／または該配列へのヌクレオチドの欠失、挿入または置換によって得ることができる機能的変異体を包含するが、ここでは、合成して得られたタンパク質の酵素活性が1個以上の遺伝子の挿入のために有利に保持されることを目的とする。エロンガーゼの酵素活性を保持するタンパク質とは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12によりコードされたタンパク質と比較して、本来の酵素活性の少なくとも10%、好ましくは20%、特に好ましくは30%。さらに好ましくは40%を有するタンパク質を意味する。このような活性を有するエロンガーゼは、酵素活性が実質的に低下していないエロンガーゼである。

また、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の相同体とは、例えば、コードおよび非コードDNA配列の細菌、真菌および植物の相同体、トランケート型配列、一本鎖DNAまたはRNAも意味する。

【0067】

配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の相同体はまた、例えば、プロモーター変異体のような誘導体も意味する。前記ヌクレオチド配列の上流にあるプロモーターは、1以上のヌクレオチド置換、挿入および／または欠失により修飾することができるが、その際、プロモーターの機能性または活性は妨害されない。さらに、プロモーターの活性を、その配

列の改変により増加するか、あるいは、さらに活性の高いプロモーター（異種生物由来のものでもよい）によってこれらのプロモーターを完全に置換することも可能である。

【0068】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示した1配列のコード領域の部分、例えば、プローブまたはプライマーとして用いることができる断片、またはPSEの生物学的に活性なセグメントをコードする断片を包含する場合もある。Physcomitrella patens、Phytophthora infestans、ThraustochytriumおよびCryptophytaのPSE遺伝子のクローニングから決定されるヌクレオチド配列によって、プローブおよびプライマーの作製が可能になり、これらは、他の細胞タイプおよび生物におけるPSE相同体を同定および／またはクローニングするために設計される。プローブ／プライマーは、通常、本質的に精製されたオリゴヌクレオチドを包含する。オリゴヌクレオチドは、通常、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示したうちの1配列のセンス鎖、あるいは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の1配列のアンチセンス鎖の少なくとも約12、好ましくは約16、さらに好ましくは25、40、50または75個の連続したヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列領域、またはその相同体、誘導体および類似体、もしくはそれらの天然の突然変異体を包含する。配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11のヌクレオチド配列に基づくプライマーをPCR反応で用いることにより、PSE相同体をクローニングすることができる。PSEヌクレオチド配列に基づくプローブを用いて、同一または同種タンパク質をコードする転写産物もしくはゲノム配列を検出することができる。好ましい実施形態では、上記プローブは、さらに、そこに結合した標識基、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素または酵素補因子も包含する。これらのプローブは、例えば、細胞サンプル中のPSEコード核酸の量を測定することにより、例えば、PSE mRNAレベルを測定することにより、PSEを誤って発現する細胞を同定するための、あるいは、ゲノムPSE遺伝子が突然変異を

起こしているかまたは欠失されているかを決定するための、ゲノムマーカー用の試験キットの一部として用いることができる。

【0069】

一実施形態では、本発明の核酸分子は、タンパク質もしくはその一部分が微生物または植物内で細胞膜の合成に必要な化合物の代謝またはこれら膜を介した分子の輸送に関与する能力を保持するのに十分な、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12のアミノ酸配列との相同性を有するアミノ酸配列を含む上記タンパク質もしくはその一部分をコードする。本明細書で用いる用語「十分な相同性」は、そのアミノ酸配列が配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12のアミノ酸配列と同一であるかまたは同等である最小数のアミノ酸残基（例えば、配列番号2～12の配列の1つに含まれるアミノ酸残基のような、類似した側鎖を有するアミノ酸残基）を有し、これによって、微生物もしくは植物内で細胞膜の合成に必要な化合物の代謝またはこれらの膜を介した分子の輸送に関与できるタンパク質またはその一部分に関係する。本明細書に記載するように、膜成分のこれら代謝経路または膜輸送系のタンパク質成分は、ファインケミカルの生産および分泌に役立つことができる。これら活性の例も本明細書に記載する。従って、「PSEの機能」は、1以上のファインケミカルの収率、生産および／または生産効率に直接的もしくは間接的に貢献している。この触媒活性のPSE基質特異性の例を表1に示す。

【0070】

さらに別の実施形態では、本発明に従う核酸の誘導体は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12の完全アミノ酸配列と、少なくとも約50～60%、好ましくは約60～70%、さらに好ましくは少なくとも約70～80%、約80～90%または90～95%、最も好ましくは少なくとも約96%、97%、98%、99%以上の相同性を有するタンパク質をコードする。アミノ酸配列の相同性は、プログラムPileUp (J. Mol. Evolution, . 25, 351-360, 1987, Higginsら、CABIOS, 5, 1989:151-153) またはBESTFITもしくはGAP (Henikoff, S. およびHenikoff, J. G. (1992) Amino acid substitution matrices from prot

ein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915-10919) を用いて、全配列領域にわたって決定した。

【0071】

本発明のPSE核酸分子によってコードされるタンパク質部分は、好ましくはいくつかのPSEのうちの1つの生物学的に活性な部分である。本明細書で用いる用語「PSEの生物学的に活性な部分」とは、微生物または植物における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、またはこれらの膜を介した分子の輸送に関与することができるか、あるいは表1に記載した活性を有する、PSEのセグメント、例えば、ドメイン／モチーフを包含するものとする。酵素活性のアッセイを実施することにより、PSEまたはその生物学的に活性な部分が、微生物または植物における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、またはこれらの膜を介した分子の輸送に関与できるか否かを決定することができる。これらのアッセイ方法は、実施例の項の実施例8で詳しく説明するが、当業者には公知である。

【0072】

PSEの生物学的に活性なセグメントをコードするその他の核酸断片は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12に示した上記配列のうち1配列の一部を単離し、PSEまたはペプチドのコード化セグメントを発現させた（例えば、in vitroでの組換え発現による）後、PSEまたはペプチドのコード化部分の活性を確認することにより作製することができる。

【0073】

さらに、本発明は、遺伝子コードの縮重によって、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示すヌクレオチド配列の1つとは異なり、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示すヌクレオチド配列によってコードされた1配列と同じPSEをコードする核酸分子を包含する。別の実施形態では、本発明に従う単離された核酸分子は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12に示したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。別の実施形態では、本発明に従う核酸分子は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12のアミ

ノ酸配列（配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示すオープンリーディングフレームによってコードされる）のアミノ酸配列と本質的に相同であり、かつ、通常の方法により同定および単離することができる全長PSEタンパク質をコードする。

【0074】

配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示したPSEヌクレオチド配列以外にも、当業者であれば、DNA配列多型が存在することを認識するだろう。これは、集団（例えば、*Physcomitrella*、*Phytophthora*、*Crypthecodinium*または*Thraustochytrium*集団）内のPSEのアミノ酸配列を変化させる。PSE遺伝子におけるこれらの遺伝的多型は、自然突然変異により、集団内の個体間に存在しうる。本明細書で用いる用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、PSE、好ましくは、*Phytophthora*、*Physcomitrella*、*Crypthecodinium*または*Thraustochytrium* PSEをコードするオープンリーディングフレームを有する核酸分子を意味する。これらの自然突然変異体は、通常、PSE遺伝子のヌクレオチド配列に1～5%の分散を生じさせる。これらヌクレオチド変異、ならびに、その結果起こったPSE中のアミノ酸多型はすべて、自然突然変異の結果であり、PSEの機能活性を改変せず、これらも本発明の範囲に含まれるものとする。

【0075】

Phytophthora、*Physcomitrella*、*Crypthecodinium*または*Thraustochytrium* cDNAの自然突然変異体および非*Physcomitrella*、非*Phytophthora*、非*Crypthecodinium*または非*Thraustochytrium*相同体、誘導体および類似体に対応する核酸分子は、本明細書に開示した*Phytophthora*、*Physcomitrella*、*Crypthecodinium*または*Thraustochytrium* PSE核酸とのその相同性のために、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で標準的ハイブリダイゼーション法に従って、ハイブリダイゼーションプローブとして*Physcomitrella*、*Phytophthora*、*Crypthecodinium*または*Thraustochytrium* cDNAもしくはその一部分を用いて、単離することができる。別の実施形態では、本発明に従う単離された核酸分子は、15ヌクレオチドの最小長さを有し、ストリンジェントな条件下で配列番号1、配列番号3、配

列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11のヌクレオチド配列を含む核酸分子とハイブリダイズする。別の実施形態では、核酸は、25、50、100、250以上のヌクレオチドの最小長さを有する。本明細書で用いる用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、互いに少なくとも60%の相同性を有するヌクレオチド配列が、通常、互いにハイブリダイズしたままの状態に残っているハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を表すものとする。このような条件は、好ましくは互いに少なくとも約65%、さらに好ましくは少なくとも約70%、さらにまた好ましくは少なくとも75%以上の相同性を有する配列が、通常、互いにハイブリダイズされたままの状態に残っているような条件である。これらのストリンジェントな条件は、当業者には公知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons. N.Y. (1989)、6.3.1-6.3.6にみいだすことができる。限定するものではないが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の好ましい例は、約45℃で、6×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム=SSC）中でハイブリダイズさせた後、50～65℃で、0.2×SSC、0.1% SDS中で1回以上洗浄する段階からなる。当業者には、これらのハイブリダイゼーション条件が、核酸の種類に応じて、また、例えば有機溶剤が存在する場合には、バッファの温度と濃度に関して違ってくことは公知である。例えば、温度は、「標準的ハイブリダイゼーション条件」下で、核酸の種類によって、0.1～5×SSC (pH 7.2) の水性バッファ中、42℃～58℃の範囲で変動する。有機溶剤（例えば、50%ホルムアミド）が前記バッファ中に存在する場合には、標準条件下での温度は約42℃である。DNA：DNAハイブリッドのハイブリダイゼーション条件は、好ましくは0.1×SSCおよび20～45℃（好ましくは、30℃～45℃）である。DNA：RNAハイブリッドのハイブリダイゼーション条件は、好ましくは0.1×SSCおよび30～55℃（好ましくは、45℃～55℃）である。これらのハイブリダイゼーション温度は、例えば、長さが約100 bp（＝塩基対）で、ホルムアミドの不在下でG+C含有率が50%の核酸について決定されたものである。当業者であれば、既述の文献、もしくは下記文献などの文献を参照にして、必要なハイブリダイゼーション条件をどのようにして決定できるかがわかるであろう：Sambrookら、"Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory

ry, 1989; HamesおよびHiggins (編) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press、オックスフォード; Brown (編) 1991, "Essential Molecular Biology: : A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press、オックスフォード。

【0076】

好ましくは、ストリンジェントな条件下で配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の配列とハイブリダイズする本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書で用いる「天然に存在する」核酸分子とは、天然に存在するヌクレオチド配列（例えば、天然タンパク質をコードするもの）を有するRNAまたはDNA分子を意味する。一実施形態では、核酸は、天然に存在するヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) PSE、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*) PSE、海洋渦鞭毛藻 (*Cryptocodinium cohnii*) PSEまたはヤブレッツボカビ属 (*Thraustothyrium*) PSEをコードする。

【0077】

集団に存在し得るPSE配列の天然に存在する変異体の他に、当業者であれば、さらに、突然変異による変化を、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11のヌクレオチド配列に導入することにより、PSEタンパク質の機能性に悪影響を与えることなく、コードされたPSEのアミノ酸配列に変化を起こすことができることがわかるであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基上にアミノ酸置換を起こすヌクレオチド置換を、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の配列に生じさせることができる。「非必須」アミノ酸残基は、PSEの活性を改変することなく、PSE (配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12) のうちの1つの野生型配列において改変することができる残基であるのに対し、「必須」アミノ酸残基は、PSE活性に必要である。しかし、その他のアミノ酸残基（例えば、PSE活性を有するドメインに、保存されていないもの、または半保存しかされていないもの）は、上記活性に必須ではないと考えられることから、恐らく、PSE活性を変えずに、改変することができるであろう。

【0078】

従って、本発明のさらに別の態様は、PSE活性に必須ではない、改変されたアミノ酸残基を含むPSEをコードする核酸分子に関する。これらのPSEは、アミノ酸配列に関して、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12の配列とは異なるが、本明細書に記載したPSE活性の少なくとも1つは保持している。一実施形態では、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を包含し、該タンパク質は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12のアミノ酸配列と少なくとも50%の相同性を有するアミノ酸配列を包含し、かつ、*Phytophthora*、*Physcomitrella*、*Cryptocodinium*または*Thraustochytrium*における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、もしくはこれらの膜を介した分子の輸送に関与することができる。上記核酸によりコードされるタンパク質は、好ましくは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12の配列の1つと少なくとも約50~60%の相同性を有し、さらに好ましくは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12の配列の1つと少なくとも約60~70%の相同性を有し、さらにまた好ましくは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12の配列の1つと少なくとも約70~80%、80~90%、90~95%の相同性を有し、最も好ましくは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12の配列の1つと少なくとも約96%、97%、98%もしくは99%の相同性を有する。

【0079】

2つのアミノ酸配列（例えば、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12のうちの1配列と、それらの突然変異した形態のうちの1つ）間または2つの核酸間の相同性%を決定するためには、最適な比較（例えば、一方のタンパク質または核酸の配列にギャップを導入することにより、他方のタンパク質または核酸との最適なアラインメントを達成するなど）が可能のように、両配列を重ねて表記する。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置に存在するアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。一方

の配列（例えば、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12の配列の1つ）内の位置に、他方の配列（例えば、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12から選択された配列の突然変異した形態）内の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドが存在する場合、該分子は、この位置で相同である（すなわち、本明細書で用いるアミノ酸または核酸「相同性」は、アミノ酸または核酸「同一性」に相当する）。両配列間の相同性%は、両配列が共有する同一位置の数の関数である（すなわち、相同性% = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100）。

【0080】

配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12のタンパク質配列と相同であるPSEをコードする、単離された核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11のヌクレオチド配列に1以上のヌクレオチド置換、付加または欠失を導入し、これにより、1以上のアミノ酸置換、付加または欠失を、コードされたタンパク質に導入させて、作製することができる。突然変異は、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介突然変異誘発のような標準的技法により、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の配列の1つに導入することができる。保存的アミノ酸置換は、1つ以上の推定上の非必須アミノ酸残基で生じさせるのが好ましい。「保存的アミノ酸置換」では、上記アミノ酸残基を、類似側鎖を有するアミノ酸残基に交換する。類似側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、専門分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β -分枝側鎖（例えば、トリオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を包含する。従って、PSEにおける推定上の非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ

酸残基に交換するのが好ましい。これ以外にも、別の実施形態では、例えば、飽和突然変異誘発により、PSEコード配列の全部または部分にわたって、ランダムに突然変異を導入した後、得られた突然変異体を、本明細書に記載したPSE活性についてスクリーニングすることによって、PSE活性を保持する突然変異体を同定することができる。配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の配列の1つに突然変異誘発を起こした後、コードされたタンパク質を組換えにより発現させ、例えば、本明細書に記載するアッセイ（実施例の節を参照）を用いて、該タンパク質の活性を決定することができる。

【0081】

前記PSEをコードする核酸分子の他に、本発明のさらに別の態様は、「アンチセンス」である、単離された核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸分子は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的なヌクレオチド配列、例えば、二重cDNA分子のコード鎖に相補的な、あるいは、mRNA配列に相補的なヌクレオチド配列を包含する。従って、アンチセンス核酸は、水素結合を介してセンス核酸に結合することができる。このアンチセンス核酸は、完全なPSEコード配列鎖、またはその一部分だけに相補的であってもよい。一実施形態では、PSEをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対して、「アンチセンス」である。「コード領域」という用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域（例えば、停止コドンで終わる、すなわち、停止コドンの直前のコドンで停止する全コード領域）を意味する。さらに別の実施形態では、アンチセンス核酸分子は、PSEをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対して「アンチセンス」である。「非コード鎖」という用語は、コード領域と隣接し、かつ、アミノ酸に翻訳されない5' および3' 配列（従って、5' -および3' -非翻訳配列とも呼ばれる）を意味する。

【0082】

上記コード鎖の、本明細書に記載するPSEコード配列（例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11に示した配列）を考慮して、本発明のアンチセンス核酸は、ワトソン-クリック塩基対合の法則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子は、PSE mRNAのコー

ド領域の全部に相補的であってもよいが、PSE mRNAのコード領域または非コード領域の一部分だけに「アンチセンス」であるオリゴヌクレオチドの方が好ましい。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、PSE mRNAの翻訳始点周辺の領域に相補的である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50以上のヌクレオチドのものとすることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが15~25ヌクレオチドであるのが有利である。本発明のアンチセンス核酸は、化学的合成および酵素の結合反応を用いて、当業者には公知の方法により構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然のヌクレオチドまたは様々な修飾ヌクレオチドを用いて、化学的に合成することができる。修飾ヌクレオチドは、分子の生物学的安定性を高める、あるいは、アンチセンス核酸とセンス核酸との間に形成された二重らせんの物理的安定性を高めるものであり、例えば、ホスホロチオエート誘導体や、アクリジンー置換ヌクレオチドを用いることができる。アンチセンス核酸を生成するのに用いることができる修飾ヌクレオチドの例としては、中でも、下記のものを挙げることができる：5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサチン、キサントシン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルクエオシン、イオシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸 (V)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、メチルウラシル-5-オキシアセテート、ウラシル-5-オキシ酢酸 (V)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)wおよび2,6-

ジアミノプリン。あるいは、核酸をアンチセンス配向にサブクローニングした発現ベクターを用いて、アンチセンス核酸を生物学的に産生させることができる（すなわち、導入した核酸により転写されるRNAは、目的とする標的核酸に対してアンチセンス配向にあり、これについては、以下の項でさらに詳しく説明する）。

【0083】

本発明のアンチセンス核酸分子は、通常、細胞に投与するか、またはin situで産生することにより、これら分子が、PSEをコードする細胞mRNAおよび／またはゲノムDNAとハイブリダイズするかまたは結合し、その結果、例えば、転写および／または翻訳を阻害することにより、当該タンパク質の発現を阻害するようにする。ハイブリダイゼーションは、安定な二重らせんを形成する通常のヌクレオチドの相補性により、あるいは、例えば、DNA二重らせんと結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの大きな間隙内での特異的相互作用によって行われる。例えば、上記アンチセンス核酸分子をペプチドまたは抗体に結合させ、それらの各々を細胞表面受容体または抗原に結合させることにより、該分子が、受容体または選択された細胞表面で発現する抗原と特異的に結合するように、該分子を修飾することもできる。また、本明細書に記載するベクターを用いて、上記細胞にアンチセンス核酸分子を与えることも可能である。上記アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するためには、該アンチセンス核酸分子が、強力な原核性、ウイルス性または真核性プロモーター（植物プロモーターを含む）の制御下にあるベクター構築物が好ましい。

【0084】

さらに別の実施形態では、本発明のアンチセンス核酸分子は α アノマー核酸分子である。 α アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成するが、その鎖は、通常の β ユニットとは対照的に、互いに平行である [Gaultierら (1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-6641]。さらに、アンチセンス核酸分子は、2'-O-メチルリボヌクレオチド [Inoueら (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148] またはキメラRNA-DNAアナログン (analogon) [Inoueら (1987) FEBS Lett. 215:327-330] を包含し得る。

【0085】

さらに別の実施形態では、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、それに対し相補的な領域を有する一本鎖核酸 (mRNAなど) を切断することができるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子である。従って、リボザイム、例えば、ハンマーヘッド型リボザイム [HaselhoffおよびGerlach (1988) Nature 334: 585-591] をPSE mRNA転写物の触媒切断に用いて、PSE mRNAの翻訳を阻害することができる。PSEをコードする核酸に対する特異性を有するリボザイムは、本明細書に開示するPSE cDNAのヌクレオチド配列 (すなわち、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11における38℃k21_g07fwd) に基づき、あるいは、本発明に教示する方法に従って単離される異種配列に基づいて設計することができる。例えば、テトラヒメナール-19-IVS RNAの誘導体を構築することができ、その際、活性部位のヌクレオチド配列は、PSEをコードするmRNAにおいて切断しようとするヌクレオチド配列と相補的である。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照されたい。この他に、PSE mRNAを用いて、RNA分子のプールの中から、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択することができる [例えば、Bartel, D.およびSzostak, J.W. (1993) Science 261: 1411-1418を参照]。

【0086】

この他に、PSEヌクレオチド配列の調節領域 (例えば、PSEプロモーターおよび/またはエンハンサー) に相補的なヌクレオチド配列を指令して、三重らせん構造を形成させ、これによって、標的細胞におけるPSE遺伝子の転写を阻害させることにより、PSE遺伝子発現を阻害することができる [概要については、Helene, C. (1991) Anticancer Drug Res. 6 (6) 569-84; Helene, C.ら (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27-36; およびMaher, L.J. (1992) Bioassays 14 (12) : 807-815]。

【0087】

B. 遺伝子構築物

本発明のさらに別の実施形態は、ツリガネゴケ属 (Physcomitrella)、エキビ

ヨウキン属 (*Phytophthora*)、クリプテコジニウム属 (*Crypthecodinium*) またはヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) に由来する単離された核酸を含む新規遺伝子構築物であり、これは脂肪酸中に少なくとも2個の二重結合がある C_{16} 、 C_{18} または C_{20} -脂肪酸を2炭素原子以上伸長させるポリペプチドをコードするか、あるいは、1以上の調節シグナルに機能的に連結して、有利に遺伝子発現を高める配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の遺伝子配列、その相同体、誘導体または類似体を含むものである。これら調節配列の例として、インデューサーまたはリプレッサーに結合し、これによって、核酸の発現を調節する配列がある。これら新規の調節配列以外にも、実際の構造遺伝子の前に、これらの配列の自然調節がまだ存在する可能性もあり、必要であれば、遺伝子的に改変され、自然調節がオフに切り替えられ、遺伝子の発現が増強されるようにする。しかし、遺伝子構築物は、これより単純な構造を有するものであってもよい。すなわち、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の配列またはその相同体の前には、追加調節シグナルを挿入していないため、その調節を有する天然プロモーターは欠失されていない。これに代わり、天然調節配列を突然変異させることにより、調節がそれ以上起きないようにし、遺伝子発現を増強する。有利なことに、上記遺伝子構築物はさらに、プロモーターに機能的に連結され、核酸配列の発現を高めることができる1以上のいわゆるエンハンサー配列を包含してもよい。また、DNA配列、例えば、さらに別の調節エレメントまたはターミネーターの3'末端で、有利な配列を挿入することも可能である。エロンガーゼ遺伝子は、遺伝子構築物において1以上のコピーで存在することができる。さらに別の遺伝子が上記遺伝子構築物に存在する場合には、生物にさらに別の遺伝子を挿入するのが有利である。

【0088】

上記新規の方法に有利な調節配列は、例えば、下記のようなプロモーター： co s、 tac 、 trp 、 tet 、 trp - tet 、 lpp 、 lac 、 lpp - lac 、 $lacI^q$ 、 $T7$ 、 $T5$ 、 $T3$ 、 gal 、 trc 、 ara 、 $SP6$ 、 λ - P_R または λ - P_L プロモーターに存在し、グラム陰性菌で用いるのが有利である。さらに有利な調節配列は、例えば、下記のプロモーターに存在

する：グラム陽性プロモーター *amy* および *SPO2*；酵母もしくは真菌プロモーター *DC1*、*MF_α*、*AC*、*P-60*、*CYC1*、*GAPDH*、*TEF*、*rp28*、*ADH*；または植物プロモーター *CaMV/35S* [Franckら、*Cell* 21 (1980) 285-294]、*PRP1* [Wardら、*Plant. Mol. Biol.* 22 (1993)]、*SSU*、*OCS*、*11b4*、*usp*、*STLS1*、*B33*、*nos*、または、ユビキチンもしくはファセオリンプロモーター。本発明では、下記のような誘導プロモーターも有利である：例えば、EP-A-0 388 186 (ベンジルスルホンアミド誘導性)、*Plant J.* 2, 1992:397-404 (Gatzら、テトラサイクリン誘導性)、EP-A-0 335 528 (アブシジン酸誘導性) または WO 93/21334 (エタノールまたはシクロヘキセノール誘導性) に記載されている各種プロモーター。その他の適切な植物プロモーターは、細胞質ゾルの FBPアーゼまたはジャガイモ *ST-LSI* プロモーター (Stockhausら、*EMBO J.* 8, 1989, 2445)、ダイズ (*Glycine max*) ホスホリボシルピロホスホネートアミドトランスフェラーゼプロモーター (GenBank登録番号 U87999) または、EP-A-0 249 676 に記載されたノード特異的プロモーター。特に有利なプロモーターは、脂肪酸生合成に関与する組織で発現を可能にするプロモーターである。非常に有利なものは、*usp*、*LEB4*、ファセオリンまたはナピンプロモーターなどの種子特異的プロモーターである。さらに有利なプロモーターは、単子葉植物または双子葉植物に用いることができる種子特異的プロモーターであり、米国特許第 5,608,152 号 (アブラナナピンプロモーター)、WO 98/45461 (シロイヌナズナファセオリンプロモーター)、米国特許第 5,504,200 号 (インゲンマメファセオリンプロモーター)、WO 91/13980 (アブラナ属 *Bce4*-プロモーター)、Baeumleinら、*Plant J.*, 2, 2, 1992:233-239 (マメ科 *LEB4* プロモーター) に記載されているが、これらのプロモーターは、双子葉植物に適している。下記のプロモーターは、例えば、単子葉植物に適している：オオムギ *1pt-2* または *1pt-1* プロモーター (WO 95/15389 および WO 95/23230)、オオムギホルデインプロモーター、ならびに、WO 99/16890 に記載されたその他の適したプロモーター。

【0089】

原則として、新規の方法には、前記のような調節配列を有するすべての天然プロモーターを使用することができる。また、さらに、合成プロモーターを用いる

ことも可能であり、有利である。

【0090】

前述のように、遺伝子構築物は、生物に導入しようとする別の遺伝子も包含することができる。酵素活性を有するために、1以上の生合成経路遺伝子の調節に関与するインデューサー、リプレッサーまたは酵素の遺伝子のような調節遺伝子を宿主生物に導入し、そこで発現させることが可能であり、しかも有利である。これらの遺伝子は、異種または同種いずれの供給源に由来するものでよい。挿入された遺伝子は、それ自身のプロモーターを持っているか、あるいは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の配列のプロモーター、またはその相同体、誘導体もしくは類似体の制御下においてもよい。

【0091】

存在するその他の遺伝子を発現させるために、遺伝子構築物は、発現を増強する3' -および/または5' -末端調節配列をさらに包含し、これらは、選択した宿主生物および遺伝子の機能に応じて、最適な発現のために選択される。

【0092】

前述のように、これらの調節配列は、遺伝子およびタンパク質発現の特異的発現を可能にする。宿主生物によって、これは、例えば、遺伝子が誘導後に初めて発現または過剰発現するか、あるいは、直ちに発現および/または過剰発現することを意味する場合もある。

【0093】

さらに、調節配列または調節因子は、好ましくは、導入された遺伝子の発現に有利な作用を及ぼし、これによって発現を増強することができる。このように、プロモーターおよび/またはエンハンサーのような強力な転写シグナルを用いて、調節エレメントを転写レベルで有利に増強することが可能である。しかし、例えば、mRNA安定性を高めることにより、翻訳を増強することも可能である。本発明の核酸配列は、少なくとも1つのリポーター遺伝子と一緒に、遺伝子構築物 (=発現カセット、核酸構築物) にクローニングした後、この遺伝子構築物を、ベクターを介して生物に、または直接ゲノムに、導入するのが有利である。このリ

ポーター遺伝子は、増殖、蛍光、化学発光、生物発光もしくは耐性アッセイ、または光量測定法により、容易に検定が可能なものでなければならない。リポーター遺伝子の例として、抗生物質または除草剤に対する耐性遺伝子、ヒドロラーゼ遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、生物発光遺伝子、糖もしくはヌクレオチド代謝遺伝子、または、Ura3遺伝子、Ilv2遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、 β ガラクトシダーゼ遺伝子、gfp遺伝子、2-デオキシグルコース-6-リン酸ホスファターゼ遺伝子、 β グルクロニダーゼ遺伝子、 β ラクタマーゼ遺伝子、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、ヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子もしくはBASTA (= グルフォシネート) 耐性遺伝子のような生合成遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子により、転写活性、従って、遺伝子発現を容易に測定および定量化することができる。これにより、ゲノムにおける、様々な生産性を示す位置の同定が可能になる。

【0094】

エロンガーゼをコードする、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11を有する本発明の核酸配列は、1以上のコピーで、発現カセット (= 遺伝子構築物) に存在し得る。

【0095】

発現カセット (= 遺伝子構築物、核酸構築物) は、宿主生物に導入しようとする、好ましくは脂肪酸生合成からの遺伝子をコードする少なくとも1つのさらに別の核酸を含んでもよい。これらの遺伝子は、別々の調節の下に、もしくは本発明のエロンガーゼ遺伝子と同じ調節領域の下にあってもよい。これらの遺伝子は、例えば、さらなる生合成遺伝子、有利には、脂肪酸生合成遺伝子であり、これにより、合成を増強することができる。これらの遺伝子として、例えば、下記のことを挙げることができる： $\Delta 19$ -、 $\Delta 17$ -、 $\Delta 15$ -、 $\Delta 12$ -、 $\Delta 9$ -、 $\Delta 8$ -、 $\Delta 6$ -、 $\Delta 5$ -、 $\Delta 4$ -デサチュラーゼ、各種ヒドロキシラーゼ、 $\Delta 12$ -アセチレナーゼ、アシル-ACPチオエステラーゼ、 β -ケトアシル-ACPシンターゼ、または β -ケトアシル-ACPレダクターゼの遺伝子。核酸構築物では、デサチュラーゼ遺伝子を用いるのが有利である。また、これら遺伝子は、1以上のコピーで、遺伝子構築物に存在し得る。

【0096】

C. 組換え発現ベクターおよび宿主細胞

本発明のさらに別の態様は、本発明の核酸、またはPSE（またはその一部分）をコードする本発明の遺伝子構築物を含む、ベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書で用いられる用語「ベクター」とは、別の核酸に結合し、これを輸送することができる核酸分子を意味する。ベクターのタイプとして、「プラスミド」があり、これは、環状の二本鎖DNAループの形態をしており、そこに、別のDNAセグメントを連結することができる。ベクターのさらに別のタイプは、ウイルスベクターであり、別のDNAセグメントを該ウイルスゲノムに連結することができる。特定のベクターは、それらが導入された宿主細胞中で自律複製が可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター、ならびに、エピソード性哺乳動物ベクター）。その他のベクター（例えば、非エピソード性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に、宿主細胞のゲノムに組み込むことにより、宿主ゲノムと一緒に複製される。加えて、特定のベクターは、それらが機能的に連結される遺伝子の発現を制御することができる。本明細書では、このようなベクターを「発現ベクター」と呼ぶ。通常、組換えDNA技法に適した発現ベクターは、プラスミドの形態をしている。本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、置き換え可能に用いる場合もある。というのは、プラスミドは、ベクターの形態で最も頻繁に用いられるものであるからである。しかし、本発明は、同様の機能を有するウイルスベクター（例えば、複製能欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ近縁ウイルス）のような他の形態の発現ベクターも包含するものとする。さらに、用語「ベクター」は、ファージ、ウイルス、例えばSV40、CMV、バキュロウイルス、アデノウイルス、トランスポソン、ISエレメント、ファスミド、ファージミド、コスミド、線状または環状DNAおよびRNAなどの、当業者には公知のその他のベクターを包含するものとする。

【0097】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞において核酸を発現するのに適した形態をした、本発明の核酸、または本発明の遺伝子構築物を包含する。すなわち、上記組換え発現ベクターは、発現に用いようとする宿主細胞に基づいて選択さ

れ、発現させようとする核酸配列に機能的に連結した1以上の調節配列を包含する。組換え発現ベクターにおいて、「機能的に連結した」とは、目的とするヌクレオチド配列が、調節配列に結合し、これによって、ヌクレオチド配列の発現が可能になり、相互に結合しすることにより、両配列が、それぞれに特有とみなされる推定機能を果たすようにすることを意味する（例えば、ベクターを宿主細胞に導入する場合には、*in vitro*転写／翻訳系または宿主細胞において機能を果たす）。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよびその他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を包含するものとする。これらの調節配列は、例えば、Goeddel: *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ（1990）に記載されている。また、下記文献も参照されたい：GuberおよびCrosby、*Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Florida編：GlickおよびThompson、第7章、89-108（その中の参照文献も含む）。調節配列は、多種の宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構成的発現を制御するもの、ならびに、特定の条件下で、特定の宿主細胞でしか、ヌクレオチド配列の直接発現を制御しないものを包含する。当業者であれば、発現ベクターの設計は、形質転換しようとする宿主細胞の選択、所望のタンパク質を発現させる範囲などの因子によって違ってくるのがわかるだろう。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、本明細書に記載した核酸（例えば、PSE、変異型PSE、融合タンパク質など）によりコードされる、融合タンパク質もしくは融合ペプチドなどのタンパク質またはペプチドを生産することができる。

【0098】

本発明の組換え発現ベクターは、原核または真核生物細胞においてPSEを発現させるために設計することができる。例えば、PSE遺伝子は、*C. glutamicum*（*C. glutamicum*）のような細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用いる）、酵母およびその他の真菌細胞〔Romanos, M. A.ら、（1992）” *Foreign gene expression in yeast: a review*”, *Yeast* 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J.ら（1991）” *Heterologous gene expression in filamentous fungi*”: *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. Lasure編, pp. 3

96-428: Academic Press: San Diego; および van den Hondel, C.A.M.J.J. およ
 び Punt, P. J. (1991) " Gene transfer systems and vector development for
 filamentous fungi: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F. ら
 、編、pp. 1-28、Cambridge University Press: Cambridge] 、藻類 [Falciator
 e ら、1999、Marine Biotechnology. 1, 3:239-251] 、下記タイプの繊毛虫: 全
 毛亜綱 (Holotrichia) 、周毛亜綱 (Peritrichia) 、旋毛綱 (Petririchia) 、
 旋毛亜綱 (Spirotrichia) 、テトラヒメナ属 (Tetrahymena) 、ゾウリムシ属 (P
 aramecium) 、コルピディウム属 (Colpidium) 、グラウコマ属 (Glaucoma) 、フ
 クロミズケムシ属 (Platyophrya) 、ポトマカス (Potomacus) 、シュードコニレ
 ンバス属 (Pseudocohnilembus) 、ユープロテス属 (Euprotos) 、エンゲルマニ
 エラ属 (Engelmaniella) および アンフィシエラ目 (Stichotrichida) 、特に、
 スティロニキア・レムネ (Stylonychia lemnae) 属の繊毛虫、多細胞植物の細胞
 [Schmidt, R. および Willmitzer, L. (1988) " High efficiency Agrobacterium
 tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and co
 tyledon explants" Plant Cell Rep.: 583-586; Plant Molecular Biology and
 Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida、第6/7章、pp.71-119 (1993
) ; F.F. White, B. Jenes ら、Techniques for Gene Transfer: Transgenic Pla
 nts, Bd. 1, Engineering and Utilization, Kung および R. Wu 編、Academic Pre
 ss (1993) 、128-43; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Bio
 l. 42 (1991) 、205-225 (およびその中の参考文献) を参照] の細胞または哺乳
 動物細胞において、ベクターを用い、WO 98/01572 に記載されているような形質
 転換方法に従って、発現させることができる。適した宿主細胞については、Goed
 del, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Pre
 ss、カリフォルニア州サンディエゴ (1990) にさらに詳しく記載されている。こ
 の他に、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて、組換
 え発現ベクターを in vitro で転写および翻訳させることもできる。

【0099】

原核生物においては、通常、融合タンパク質または非融合タンパク質の発現を
 制御する構成または誘導プロモーターを含むベクターを用いて、タンパク質を発

現させる。融合ベクターは、一連のアミノ酸を、そこにコードされているタンパク質に、通常は組換えタンパク質のアミノ末端に付加するが、C末端で付加することもある。タンパク質中の適した領域内に融合することもある。これらの融合ベクターは、3つの働き、すなわち、1) 組換えタンパク質の発現を増強すること；2) 組換えタンパク質の溶解性を高めること；3) 例えば、いわゆるhisタグを介して、アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することにより、組換えタンパク質の精製を容易にすること、を有する。融合発現ベクターの場合には、タンパク質加水分解による切断部位は、融合単位と組換えタンパク質が連結された部位で、導入されることが多く、これにより、組換えタンパク質を融合タンパク質の精製後に融合単位から分離することができる。これら酵素とそれに対応する認識配列は、第Xa因子、トロンビンおよびエンテロキナーゼを包含する。

【0100】

典型的な融合発現ベクターとしては、中でも、pGEX [Pharmacia Biotech Inc ; Smith, D. B.およびJohnson, K. S. (1988) Gene 67:31-40]、pMAL [New England Biolabs、マサチューセッツ州バーバーリー] およびpRIT5 [Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ] が挙げられ、これらのベクターでは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、マルトース-E-結合タンパク質またはブロテインAが、組換え標的タンパク質に融合される。一実施形態では、PSEコード配列をpGEX発現ベクターにクローニングすることにより、融合タンパク質をコードするベクターを作製する。ここで、該融合タンパク質は、N末端からC末端で、GST-トロンビン切断部位-X-タンパク質を包含する。融合タンパク質は、グルタチオン-アガロース樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。GSTと融合していない組換えPSEは、トロンビンを用いて融合タンパク質を切断することによって得ることができる。

【0101】

好適な誘導非融合大腸菌発現ベクターの例として、中でも、pTrc (Amannら (1988) Gene 69 : 301-315) およびpET 11d (Studierら、Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press、カリフォルニア州サンディ

エゴ (1990) 60-89) が挙げられる。pTrcベクターの標的遺伝子発現は、ハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼによる転写に基づいて起こる。pET 11dベクターからの標的遺伝子発現は、T7-gn10-lac融合プロモーターからの転写に基づき、この転写は、共発現したウイルスRNAポリメラーゼ (T7 gn1) によって媒介される。上記ウイルスポリメラーゼは、lacUV 5プロモーターの転写制御下でT7 gn1遺伝子を保有する常在性λプロファージによって、宿主株BL21 (DE3) またはHMS174 (DE3) により提供される。

【0102】

原核生物での使用に適したその他のベクターは、当業者には公知であり、このようなベクターは、例えば、下記のものに存在する：大腸菌pLG338、pACYC184、pBR322のようなpBRシリーズ、pUC18またはpUC19のようなpUCシリーズ、M13mpシリーズ、pKC30、pRep4、pHS1、pHS2、pLc236、pMBL24、pLG200、pUR290、pIN-IIT¹³-B1、pgt11またはpBdCI；ストレプトミセス属pIJ101、pIJ364、pIJ702またはpIJ361；バチルス属pUB110、pC194またはpBD214、コリネバクテリウム属pSA77またはpAJ667。

【0103】

組換えタンパク質の発現を最大限にする戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解により切断する能力が破壊されている宿主細菌においてタンパク質を発現させるというものである [Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ (1990) 119-128]。さらに別の戦略によれば、発現ベクターに挿入しようとする核酸の核酸配列を改変することにより、各アミノ酸の個々のコドンが、*C. glutamicum* (*C. glutamicum*) のように、発現のために選択した細菌で優先的に用いられるようにする [Wadaら (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118]。本発明のこれらの核酸配列の改変は、標準的DNA合成方法により実施される。

【0104】

さらに別の実施形態では、PSE発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母菌サッカロミセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*) における発現のためのベクターの例として、pYepSec1 [Baldariら (1987) Embo J.6:229-234]、pMFa [Kurja

nおよびHerskowitz (1982) *Cell* 30:933-943]、pJRY88 [Schultzら (1987) *Gene* 54:113-123] およびpYES2 [Invitrogen Corporation、カリフォルニア州サンディエゴ] が挙げられる。糸状菌のようなその他の真菌で用いるのに適したベクターを構築するためのベクターおよび方法として、下記に詳しく記載されたものが挙げられる：van den Hondel, C.A.M.J.J.およびPunt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi : Applied Molecular Genetics of fungi, J.F. Peberdyら編、pp. 1-28、Cambridge University Press : ケンブリッジ、もしくは : More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure編、pp. 396-428 : Academic Press : サンディエゴ]。さらに適した酵母ベクターとして、例えば、pAG-1、YEp6、YEp13またはpEMLYe23が挙げられる。

【0105】

上記以外に、本発明のPSEは、バキュロウイルス発現ベクターを用いて、昆虫細胞で発現させてもよい。培養した昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）においてタンパク質を発現させるために使用可能なバキュロウイルスベクターとしては、pAcシリーズ [Smithら (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165] およびpVLシリーズ [LucklowおよびSummers (1989) *Virology* 170:31-39] が挙げられる。

【0106】

前記ベクターは、考えられる好適なベクターのほんの一部を挙げたものにすぎない。その他のプラスミドは、当業者には公知であり、例えば、下記に記載されている : Cloning Vectors (Pouwels, P.H.ら編、Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018)。

【0107】

さらに別の実施形態では、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを用いて、哺乳動物細胞において発現させる。哺乳動物発現ベクターの例として、pCDM8 [Seed, B. (1987) *Nature* 329:840] およびpMT2PC [Kaufmanら (1987) *EMBO J.* 6:187-195] が挙げられる。哺乳動物細胞に用いる場合には、発現ベクターの制御機能は、ウイルス調節エレメントにより賦与されることが多い。通常用いられるプロモーターは、例えば、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス

スおよびシミアンウイルス⁴⁰に由来するものである。原核および真核細胞に適したその他の発現系は、下記の文献中にみいだすことができる：Sambrook, J., Fritsch, E.F.およびManiatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、第2版の第16および17章、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor、ニューヨーク州、1989)。

【0108】

別の実施形態では、組換え哺乳動物発現ベクターは、好ましくは特定の細胞型において、核酸の発現を制御することができる（例えば、組織特異的調節エレメントを用いて核酸を発現する）。組織特異的調節エレメントは、当業者には公知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例として、中でも、下記のものが挙げられる：アルブミンプロモーター [肝特異的；Pinkertら (1987) *Gene Dev.* 1: 268-277]、リンパ球特異的プロモーター [CalameおよびEaton (1988) *Adv. Immunol.* 43: 235-275]、特に、T-細胞受容体のプロモーター [WinotoおよびBaltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733] およびイムノグロビン [Banerjiら (1983) *Cell* 33:729-740; QueenおよびBaltimore (1983) *Cell* 33:741-748]、ニューロン特異的プロモーター [例えば、神経フィラメントプロモーター；ByrneおよびRuddle (1989) *PNAS* 86:5473-5477]、膵特異的プロモーター [Edlundら (1985) *Science* 230:912-916] および哺乳動物特異的プロモーター [例えば、乳清プロモーター；米国特許第4, 873, 316号およびEP-A-0 264 166]。また、発生調節プロモーター、例えば、マウス hox プロモーター [KesselおよびGruss (1990) *Science* 249:374-379] およびフェトプロテインプロモーター [CampesおよびTilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546] も含まれる。

【0109】

さらに別の実施形態では、本発明のPSEは、単細胞植物細胞（藻類など）(Falciatoreら、1999、*Marine Biotechnology* 1 (3) : 239-251およびそこで引用される参考文献を参照)、ならびに、それより高等の植物（例えば、穀物のような種子植物）由来の植物細胞において発現させることができる。植物発現ベクターの例として、下記の文献に詳しく記載されているものが挙げられる：Becker, D., Kemper, E., Schell, J.およびMasterson, R. (1992) " New plant binary ve

ctors with selectable markers located proximal to the left border” , Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197 ; ならびに、Bevan, M.W. (1984) ” Binary Agrobacterium vectors for plant transformation” , Nucl. Acids Res. 12:8711-8721 ; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants : Transgenic Plants、第1巻、Engineering and Utilization、KungおよびR. Wu編、Academic Press, 1993 , pp. 15-38。さらに好適な植物ベクターは、中でも、” Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology” (CRC Press) 、第6/7章、pp.71-119に記載されている。有利なベクターは、いわゆるシャトルベクターまたはバイナリーベクターであり、これらは、大腸菌およびアグロバクテリウム属において複製する。

【0110】

植物発現カセットは、好ましくは、植物細胞における遺伝子発現を制御することができ、かつ、機能的に連結された調節配列を含み、これによって、各配列は、転写終結シグナル、例えば、ポリアデニル化シグナルなどの機能を果たすことができる。好ましいポリアデニル化シグナルは、オクトピンシンターゼ [Gielenら、EMBO J. 3 (1984) 835以下参照] またはその機能的同等物として知られるTiプラスミドpTiACH5の遺伝子3のようなアグロバクテリウムツメファシエンストDNAから誘導されたものであるが、その他、植物において機能的に活性なターミネーターもすべて適している。

【0111】

非常に多くの場合、植物遺伝子発現は、転写レベルに限定されないことから、植物発現カセットは、翻訳エンハンサー、例えば、オーバードライブ配列のような機能的に連結された別の配列を含むのが好ましい。このオーバードライブ配列は、5' -非翻訳タバコモザイクウイルスリーダー配列を含み、この配列が、タンパク質/RNA比を高める [Gallieら、1987、Nucl. Acids Research 15:8693-8711] 。

【0112】

植物遺伝子発現は、適したプロモーターに機能的に連結させて、このプロモーターが、細胞または組織特異的に、適正なタイミングで、遺伝子発現をもたらす

ようにしなければならない。好ましいプロモーターは、構成的発現を起こすもの [Benfeyら、EMBO J. 8 (1989) 2195-2202] であり、例えば、35S CaMV [Franckら、Cell 21 (1980) 285-294]、19S CaMV (米国特許第5,352,605号およびWO 84/02913も参照) のような植物ウイルスから誘導されるもの、または、米国特許第4,962,028号に記載されているRubisco小サブユニットプロモーターのような植物プロモーターがある。

【0113】

植物遺伝子発現カセットにおける機能的連結のために用いるのに好ましいその他の配列は、ターゲッティング配列であり、これは、その対応する細胞小器官における遺伝子産物を、例えば、液胞、核、アミロプラスト、葉緑体および有色体のようなあらゆる種類の色素体、細胞外空間、ミトコンドリア、小胞体、エライオプラスト、ペロキシソームおよびその他の植物細胞小器官に、ターゲッティングするのに必要である [詳しくは、Kermode、Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423およびそこに引用された参考文献を参照]。

【0114】

植物遺伝子発現はまた、化学的に誘導可能なプロモーター [詳しくは、Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108を参照] を介して促進することも可能である。遺伝子発現が、タイミングに関して特異的に起こるようにしたい場合には、化学的に誘導可能なプロモーターが特に適している。このようなプロモーターの例として、サリシル酸誘導プロモーター (WO 95/19443)、テトラサイクリン誘導プロモーター [Gatzら (1992) Plant J. 2, 397-404] およびエタノール誘導性プロモーターが挙げられる。

【0115】

その他の適したプロモーターは、生物または非生物のストレス条件に応答するプロモーター、例えば、病原体誘導性PRP1遺伝子プロモーター [Wardら、Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366]、熱誘導性トマトhsp80プロモーター (米国特許第5,187,267号)、低温誘導性ジャガイモ α アミラーゼプロモーター (WO 96/12814) または損傷誘導性pinIIプロモーター (EP-A-0 375 091) である。

【0116】

特に好ましいプロモーターは、脂質および油生合成が行われる組織および器官において、内乳細胞のような種子細胞において、そして発育中の胚の細胞において、遺伝子発現を引き起こすものである。好適なプロモーターとして、下記を挙げることができる：アブラナナピン (napin) 遺伝子プロモーター (米国特許第5,608,152号)、*der Vicia faba* USPプロモーター [Baeumleinら、Mol Gen Genet, 1991, 225 (3) : 459-67]、シロイヌナズナオレオシンプロモーター (WO 98/45461)、インゲンマメファセオリンプロモーター (米国特許第5,504,200号)、アブラナBce4プロモーター (WO 91/13980) またはレグミンB4プロモーター [LeB4; Baeumleinら、1992、Plant Journal, 2 (2) : 233-9]、ならびに、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、ライムギ、コメなどの単子葉植物に種子特異的発現を起こすプロモーター。特に好適なプロモーターとして、オオムギ γ pt2もしくは γ pt1遺伝子プロモーター (WO 95/15389およびWO 95/23230)、または、WO 99/16890に記載されたプロモーター (オオムギホルデイン遺伝子、コメグルテリン遺伝子、コメオリジン (oryzin) 遺伝子、コメプロラミン遺伝子、コムギグリジン遺伝子、コムギグルテリン遺伝子、トウモロコシゼイン遺伝子、オートムギグルテリン遺伝子、モロコシカジン遺伝子、およびライムギセカリン遺伝子に由来するプロモーター) がある。

【0117】

また、色素体特異的発現を起こすプロモーターも特に適している。というのは、色素体は、脂質生合成の前駆体、およびいくつかの最終産物が合成される細胞小器官だからである。ウイルスRNAポリメラーゼプロモーターのような好適なプロモーターは、WO 95/16783およびWO 97/06250に、また、シロイヌナズナc1pPプロモーターについては、WO 99/46394に記載されている。

【0118】

本発明はさらに、アンチセンス配向で発現ベクターにクローニングした、本発明のDNA分子を包含する組換え発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子を調節配列に機能的に連結することにより、PSE mRNAに対して「アンチセンス」のRNA分子の発現 (DNA分子の転写により発現される) が可能になる。調節配列は、アンチセンス配向でクローニングされた核酸に機能的に連結され、かつ、多数の細

胞型においてアンチセンスRNA分子の連続的発現を制御するもの、例えば、ウイルスプロモーターおよび／またはエンハンサーから選択するか、あるいは、アンチセンスRNAの構成的、組織特異的もしくは細胞型特異的発現を制御する調節配列を選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、アンチセンス核酸が、非常に効果的な調節領域の制御下で生産される、組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒化ウイルスの形態で存在することができ、該領域の活性は、ベクターが導入された細胞型により決定することができる。アンチセンス遺伝子を用いた遺伝子発現の調節について詳しくは、Weintraub, H.ら、Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics、第1巻(1) 1986を参照されたい。

【0119】

本発明のさらに別の態様は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書では置き換え可能に用いる。もちろん、これらの用語は、特定の標的細胞を指すものではなく、この細胞の子孫または潜在的子孫も意味する。特定の改変は、突然変異または環境影響により、後の世代で起こる可能性もあるため、この子孫は、必ずしも母細胞と同じわけではないが、本明細書で用いる用語が意味する範囲に含まれる。

【0120】

宿主細胞は、原核または真核生物いずれの細胞でもよい。例えば、PSEは、C. グルタミンウム (C. glutamicum) のような細菌細胞、昆虫細胞、真菌細胞または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) またはCOS細胞など）、藻類、繊毛虫、植物細胞、真核またはC. グルタミンウム (C. glutamicum) のようなその他の微生物において発現させることができる。その他の好適な宿主細胞は、当業者には公知である。

【0121】

ベクターDNAは、通常の形質転換またはトランスフェクション方法により、原核または真核生物細胞に導入することができる。本明細書で用いる「形質転換」および「トランスフェクション」、「接合」および「形質導入」は、宿主細胞に

外来核酸（例えば、DNA）を導入するための、当業者には公知の多数の方法を包含し、例えば、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、自然受容能、化学的媒介導入、エレクトロポレーションまたは粒子ボンバードメントなどが挙げられる。植物細胞を含む、宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションに適した方法は、下記の文献にみいだすことができる：Sambrookら（*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor、ニューヨーク州、1989）およびその他の研究室テキスト、例えば、*Methods in Molecular Biology*, 1995、第44巻、*Agrobacterium protocols*、GartlandおよびDavey編、Humana Press、ニュージャージー州トトワ。

【0122】

哺乳動物細胞の安定トランスフェクションについては、用いられる発現ベクターおよびトランスフェクション方法によっては、少数の細胞しか、外来DNAをそのゲノムに組み込めないことが知られている。これらの組込み体（integrants）を同定および選択するためには、通常、選択マーカーをコードする遺伝子（例えば、抗生物質に対する耐性）を、目的とする遺伝子と一緒に宿主細胞に導入する。好ましい選択マーカーは、G418、ヒグロマイシンおよびメトトレキセートのような薬剤に耐性を賦与するもの、あるいは、植物では、グリホスフェート（glyphosphate）またはグルホシネート（glufosinate）のような除草剤に対する耐性を賦与するものを包含する。さらに好適なマーカーは、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、ura3またはilv2のような糖またはアミノ酸の生合成経路に関与する遺伝子をコードするマーカーである。ルシフェラーゼ、gfpまたはその他の蛍光遺伝子などの遺伝子をコードするマーカーも適している。これらのマーカーは、これらの遺伝子が機能的ではない突然変異体で用いることができる。何故なら、上記遺伝子は、例えば、通常の方法によって、欠失されているからである。さらに、選択マーカーをコードする核酸をコードするマーカーを、PSEをコードするのと同じベクター上で宿主細胞に導入する、あるいは、別のベクター上で導入することもできる。導入した核酸により安定してトランスフェクションされた細胞は、

例えば、薬剤選択（例えば、選択マーカーを有する細胞は生存するのに対し、他の細胞は死滅する）によって同定することができる。

【0123】

相同的な組換え微生物を生産するためには、PSE遺伝子の少なくとも1セグメントを含むベクターを産生する。尚、この遺伝子に、欠失、付加または置換を導入することにより、PSE遺伝子を修飾する、例えば、該遺伝子を機能的に破壊しておく。このPSE遺伝子は、好ましくは、ツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、エキビヨウキン属 (*Phytophthora*)、クリプテコジニウム属 (*Cryptocodium*) またはヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) PSE遺伝子であるが、その他の生物、哺乳動物、真菌もしくは昆虫由来の相同体または類似体も用いることもできる。好ましい実施形態では、相同的組換え時に、内在性PSE遺伝子が機能的に破壊されるようにベクター（すなわち、機能タンパク質をそれ以上コードしない：ノックアウトベクターともよばれる）を設計する。これ以外にも、相同的組換え時に、内在性PSE遺伝子が突然変異する、あるいは、改変されるものの、依然として機能タンパク質をコードする（例えば、上流調節領域を改変することにより、内在性PSEの発現を改変する）ように、ベクターを設計することもできる。相同的組換えによって点突然変異を発生させるためには、キメラ形成法としても知られ、Cole-Straussら、1999、*Nucleic Acids Research* 27 (5) : 1323-1330 および Kmiec, *Gene Therapy*, 1999, *American Scientist*, 87 (3) : 240-247に記載されているDNA-RNAハイブリッドを用いることもできる。

【0124】

相同的組換え用のベクターでは、PSE遺伝子の改変セグメントには、PSE遺伝子の別の核酸が、その5' および3' 末端に隣接しているため、ベクター上に存在する外因性PSE遺伝子と、微生物または植物中の内在性PSE遺伝子との間で、相同的組換えが可能である。隣接する別のPSE核酸は、内在性遺伝子との相同的組換えを達成するのに十分な長さを有する。通常、数百塩基対からキロベースの隣接DNA (5' および3' 末端の両方で) が、ベクター上に存在する [相同的組換えのためのベクターについては、例えば、Thomas, K. R. および Capecchi, M. R. (1987) *Cell* 51:503を、また、cDNAに基づくヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)

ns) における組換えに関しては、Streppら、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (8) : 4368-4373を参照]。上記ベクターは、微生物または植物細胞に導入し（例えば、ポリエチレングリコール媒介DNAにより行う）、次に、導入されたPSE遺伝子が、内在性PSE遺伝子との相同的組換えを受けた細胞を、当業者には公知の方法を用いて選択する。

【0125】

別の実施形態では、導入された遺伝子の調節発現を可能にする選択された系を含む、植物の微生物のような組換え生物を産生することができる。lac-オペロンの制御下に置かれたベクターへのPSE遺伝子の組込みにより、例えば、IPTGの存在下でのみPSE遺伝子の発現が可能となる。これらの調節系は、当業者には公知である。

【0126】

培養もしくは野生いずれかで生育する、原核または真核宿主細胞などの、本発明の宿主細胞を用いて、PSEを生産する（すなわち、発現させる）ことができる。植物では、エレクトロポレーションまたはアグロバクテリウム媒介遺伝子導入により、発育中の花にDNAを直接導入することからなる、さらに別の方法を用いることができる。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を用いてPSEを生産する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、本発明の宿主細胞（そこに、PSEをコードする組換え発現ベクターが導入されているか、または、そのゲノムに、野生型もしくは改変型PSEが導入されている）を適当な培地で生育し、PSEを生産することからなる。さらに別の実施形態では、この方法は、培地または宿主細胞からPSEを単離することを包含する。

【0127】

本発明の核酸を取り込むのに一般的に適した宿主細胞、本発明の新規な遺伝子産物、または本発明のベクターは、いずれの原核または真核生物であってよい。有利に用いられる宿主生物は、細菌、真菌、酵母などの生物、動物細胞または植物細胞である。さらに有利な生物は、動物、あるいは、好ましくは、植物またはそれらの一部分である。「動物」という用語は、ヒトを含まないものとして理解される。真菌、酵母または植物を用いるのが好ましいが、特に、多量の脂質化合

物を含有する油穀物などの植物、例えば、アブラナ、マツヨイグサ、ヒマシ油植物、キャノーラ、ラッカセイ、アマニ、ダイズ、ベニバナ、ヒマワリ、ルリヂサ、ギネアアブラヤシ、ココナツ；あるいは、トウモロコシ、コムギ、ライムギ、オートムギ、ライコムギ、コメ、オオムギ、ワタ、キャッサバ、コショウ、マンジュギクなどの植物；ジャガイモ、タバコ、ナスおよびトマトなどのナス科植物；ソラマメ属種、エンドウ、ムラサキウマヤゴシ、低木（コーヒー、カカオ、茶）、ヤナギ属種、樹木（ギネアアブラヤシ、ココナツ）ならびに、多年生草および飼料穀物が非常に好ましい。本発明において、特に好ましい植物は、ダイズ、ラッカセイ、アブラナ、キャノーラ、ヒマシ油植物、アマニ、マツヨイグサ、ヒマワリ、ベニバナ、樹木（ギネアアブラヤシ、ココナツ）などの油穀物である。

【0128】

本発明の特に好ましい態様は、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明のベクターを含む植物細胞に関する。さらには、本発明の植物細胞を含むトランスジェニック植物または植物組織が好ましい。本発明のさらに別の態様は、採取することができる本発明の植物の一部分、ならびに、本発明の核酸を発現する本発明の植物細胞、もしくは、本発明のタンパク質を高レベルで含有する細胞のいずれかを含む、本発明のトランスジェニック植物を増殖させるのに適した材料に関する。原則として、植物の全部分、特に、花、花粉、果実、苗木、根、葉、種子、塊茎、幹などを採取することができる。増殖材料として、例えば、種子、果実、苗木、塊茎、挿し木および根茎が挙げられる。

【0129】

D. 単離されたPSE

本発明のさらに別の態様は、単離されたPSEおよびその生物学的に活性な部分に関する。「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分とは、組換えDNA方法により生産された場合には細胞材料を本質的に含まず、また、化学的に合成された場合には化学的前駆体またはその他の化学物質を本質的に含まない。「細胞材料を本質的に含まない」という用語は、タンパク質が、それが天然にもしくは組換えにより生産される細胞の細胞成分から分離されたPSE調製物を意味する。一実施形態では、用語「細胞材料を本質的に含

まない」は、非PSE（本明細書では、「汚染タンパク質」とも呼ぶ）の含有率が、約30%（乾量に基づく）より少ない、さらに好ましくは約20%より少ない、さらにまた好ましくは約10%より少ない、最も好ましくは約5%より少ないPSE調製物を意味する。PSEまたはその生物学的に活性な部分が、組換え方法によって生産される場合には、これも、培養培地をほとんど含まない、すなわち、培養培地の量が、タンパク質調製物の量の約20%より少ない、さらに好ましくは約10%より少ない、さらにまた好ましくは約5%より少ない。用語「化学的前駆体またはその他の化学物質を本質的に含まない」とは、タンパク質が、その合成に関与する化学的前駆体またはその他の化学物質から分離されたPSE調製物を意味する。一実施形態では、用語「化学的前駆体またはその他の化学物質を本質的に含まない」とは、化学的前駆体または非PSE化学物質の含有率が、約30%（乾量に基づく）より少ない、さらに好ましくは約20%より少ない、さらにまた好ましくは約10%より少ない、最も好ましくは約5%より少ないPSE調製物を意味する。好ましい実施形態では、単離されたタンパク質またはその生物学的に活性な部分は、PSEが由来する同じ生物からの汚染タンパク質を一切呈示しない。しかし、本発明のタンパク質が、配列番号10に示した配列を含む、または、配列番号9を含む遺伝子によってコードされる場合には、該配列が、2つのMetで開始することを考慮に入れなければならない。対応するコード核酸配列の翻訳では、これによって、第1または第2Metで開始する、本発明のタンパク質の2つの誘導体の発現が起こる可能性がある。両誘導体の発現比は、発現または宿主生物の種類に応じて、0～1の間を変動する。従って、前記誘導体の両方、もしくはそのうち一方だけを含むPSEも本発明に包含される。両誘導体は、活性、局在化、半減期、調節機構などが異なってもよい。これらのタンパク質は、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) もしくは前述の植物、または、微生物：例えば、大腸菌、枯草菌、*C. グルタミンウム* (*C. glutamicum*) などの細菌、モルチエレラのような真菌、サッカロミセス属のような酵母、あるいは、コルピジウム (*Colpidium*) のような繊毛虫もしくはフェイダクチルム (*Phaeodactylum*) のような藻類において、通常、組換え発現により生産されるもので、例えば、ツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、エキビョウキン属 (*Phytophthora*)、クリプテコジニウム

属 (Crypthecodinium) またはヤブレッツボカビ属 (Thraustochytrium) PSEである。

【0130】

本発明の単離されたPSEまたはその一部分は、ツリガネゴケ属 (Physcomitrella)、エキビヨウキン属 (Phytophthora)、クリプテコジニウム属 (Crypthecodinium) またはヤブレッツボカビ属 (Thraustochytrium) における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、あるいは、これら膜を介した分子の輸送にも関与している可能性がある。好ましい実施形態では、上記タンパク質またはその一部分は、これらが、ツリガネゴケ属 (Physcomitrella)、エキビヨウキン属 (Phytophthora)、クリプテコジニウム属 (Crypthecodinium) またはヤブレッツボカビ属 (Thraustochytrium) における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、あるいは、これら膜を介した分子の輸送に卷よする能力を保持する上で、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12のアミノ酸配列と十分な相同性を有するアミノ酸配列を含む。上記タンパク質の一部分は、好ましくは、本明細書に記載されている生物学的に活性な部分である。さらに好ましい実施形態では、本発明のPSEは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12に示すアミノ酸配列の1つを有する。さらに好ましい実施形態では、上記PSEは、例えば、ストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を有する。さらに別の好ましい実施形態では、上記PSEは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12のアミノ酸配列の1つと、少なくとも約50~60%、好ましくは少なくとも約60~70%、より好ましくは少なくとも約70~80%、80~90%、90%~95%、さらに好ましくは少なくとも約96%、97%、98%、99%以上の相同性を有するヌクレオチド配列によりコードされたアミノ酸配列を有する。また、本発明の好ましいPSEは、本明細書に記載したPSE活性の少なくとも1つを有するのが好ましい。例えば、本発明の好ましいPSEは、例えば、ストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11のヌクレオチド

配列とハイブリダイズし、かつ、ツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、エキビョウキン属 (*Phytophthora*)、クリプテコジニウム属 (*Crypthecodinium*) またはヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、あるいは、これら膜を介した分子の輸送に関与すると共に、少なくとも2つの二重結合と、 C_{16} または C_{18} の鎖長を有する1以上の高度不飽和脂肪酸を伸長することができるヌクレオチド配列によりコードされたアミノ酸配列を含む。

【0131】

別の実施形態では、PSEは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12に示すアミノ酸配列と本質的に相同であり、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12の配列のうち1配列のタンパク質の機能的活性を保持し、それらのアミノ酸配列は、前記の第I項で詳しく記載したように、自然突然変異または突然変異誘発によって異なる。さらに別の実施形態では、上記PSEは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12の完全アミノ酸配列と、少なくとも約50~60%、好ましくは少なくとも約60~70%、さらに好ましくは少なくとも約70~80%、80~90%、90~95%、最も好ましくは少なくとも約96%、97%、98%、99%以上の相同性を有し、かつ、本明細書に記載したPSE活性の少なくとも1つを有するアミノ酸配列を含むタンパク質である。別の実施形態では、本発明は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12の完全アミノ酸配列と本質的に相同的な、完全なツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、エキビョウキン属 (*Phytophthora*)、クリプテコジニウム属 (*Crypthecodinium*) またはヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) タンパク質に関する。

【0132】

PSEの生物学的に活性な部分とは、PSEのアミノ酸配列、例えば、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10および配列番号12に示すアミノ酸配列から誘導されたアミノ酸配列、あるいは、PSEと相同的なタンパク質のアミノ酸配列を含むペプチドを意味する。尚、上記ペプチドは、アミノ酸が、PSEと相同の全長PSEまたは全長タンパク質より少なく、かつ、PSEの少なくとも1

つの活性を有する。生物学的に活性な部分（ペプチド、例えば、長さが、例えば、5、10、15、20、30、35、36、37、38、39、40、50、100以上のアミノ酸を有するペプチド）は、通常、PSEの少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを包含する。さらに、これ以外にも、上記タンパク質のその他の領域が欠失した、生物学的に活性な他の部分は、組換え方法により産生し、前記活性の1以上に関して実験することができる。PSEの生物学的に活性な部分は、好ましくは、生物学的活性を有する1以上の選択されたドメイン／モチーフまたはそれらの一部分を包含する。

【0133】

このようなドメインおよびモチーフのいくつかは、例えば、コンピュータ支援方法を用いて、配列分析により同定することができる。

【0134】

本発明の配列は、例えば、KKモチーフを含むことがわかっている。

【0135】

Kermodeは、1996年、Plant Sciences 15 (4) :285-423のCritical Reviewsで、KKモチーフ、すなわち、二重リシンについて記載している。これは、主としてKXXまたはK X K XXXモチーフであることがわかっており、ERからGolgi装置への再循環に、従って、タンパク質の滞留時間、ならびに、特定位置、特にERにおいてその酵素の活性に影響を与える。

【0136】

二重リシンモチーフはまた、例えば、 $\Delta 12$ -デサチュラーゼにおいてみとめられており (Arondelら1992、Science 258:1353)、これらは、本発明のエロンガーゼにも存在する。特に、C末端に局在化できるモチーフが記載されている。本発明の配列では、C末端に、リシンの顕著な蓄積がある。

【0137】

コケ (Moss) エロンガーゼPSE1 : C末端 KQKGAKTE

配列番号2 : KTKKA

配列番号4 : KKSTPAKKTN

配列番号6 : KHLK

これらは、遺伝子変異である可能性がある。

【0138】

ERでまたはER内でのターゲッティング、アドレッシング (addressing) および局在化に影響を与えるLys基がある。例えば、GFP「緑色蛍光タンパク質」との融合により、C末端の末端近傍における上記配列のマスキング、改変または空間的改変を用いて、区画化に影響を与えることができる。

【0139】

PSEは、組換えDNA方法により生産されるのが好ましい。例えば、タンパク質をコードする核酸分子を発現ベクターにクローニングした（前記のように行う）後、発現ベクターを宿主細胞に導入し（前記のように行う）、PSEを宿主細胞で発現させる。次に、適切な精製スキームにより、タンパク質精製の標準的方法を用いて、その細胞からPSEを単離することができる。組換え発現の別の方法として、ペプチド合成の標準的方法により、PSE、PSEポリペプチドまたはPSEペプチドを化学的に合成することができる。さらに、例えば、本発明のPSEまたはその断片を用いて、標準的技法により作製することができる抗PSE抗体を用いて、天然PSEを細胞（例えば、内皮細胞）から単離することができる。

【0140】

本発明は、キメラPSEタンパク質またはPSE融合タンパク質も提供する。本明細書で用いる「キメラPSEタンパク質」または「PSE融合タンパク質」とは、非PSEポリペプチドと機能的に結合されたPSEポリペプチドを包含する。「PSEポリペプチド」とは、PSEに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味するのに対し、「非PSEポリペプチド」は、PSEと本質的に相同的でないタンパク質（例えば、PSEとは異なり、かつ、同じまたは別の生物に由来するタンパク質）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。融合タンパク質の範囲内で、「機能的に結合された」という用語は、PSEポリペプチドと非PSEポリペプチドが、互いに融合し、これによって、両配列が、使用した配列に特有とみなされる推定機能を果たす、という意味であることを理解すべきである。非PSEポリペプチドは、PSEポリペプチドのN末端またはC末端に融合することができる。一実施形態では、融合タンパク質は、例えば、PSE配列がGST配列のC末端に融合したGST

-PSE融合タンパク質である。これらの融合タンパク質は、組換えPSEの精製を促進することができる。さらに別の実施形態では、融合タンパク質は、そのN末端で、異種シグナル配列を有するPSEである。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物細胞）では、異種シグナル配列を用いることにより、PSEの発現および／または分泌を高めることができる。

【0141】

本発明のキメラPSEタンパク質またはPSE融合タンパク質は標準的組換えDNA法により生産される。例えば、様々なポリペプチド配列をコードするDNA断片は、通常の技法を用いて、適正なリーディングフレーム内で互いに連結させる。このような技法には、例えば、平滑末端または付着末端を用いた連結、制限酵素切断による適切な末端の賦与、付着末端の充填、必要に応じて、アルカリホスファターゼを用いた処理による不要な連結の除去、ならびに、酵素連結などがある。さらに別の実施形態では、融合遺伝子は、DNA合成装置などの通常の技法により、合成することができる。この他にも、アンカープライマーを用いて、遺伝子断片のPCR増幅を実施することができる。このアンカープライマーは、連続する遺伝子断片の間に、相補的突出部を形成し、これをハイブリダイズさせ、再増幅することにより、キメラ遺伝子配列を産生する（例えば、Current Protocols in Molecular Biology、Ausubelら編、John Wiley & Sons：1992を参照）。さらに、融合単位（例えば、GSTポリペプチド）をすでにコードする多数の発現ベクターが市販されている。PSEをコードする核酸をこのような発現ベクターにクローニングすることにより、融合単位を適正なリーディングフレーム内でPSEタンパク質に連結させることができる。

【0142】

PSE相同体は、突然変異誘発、例えば、特異的 point 突然変異、あるいは、PSEの切断により産生することができる。本明細書で用いる「相同体」とは、PSE活性のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用するPSEの変異型を意味する。PSEアゴニストは、PSEと同じ活性、もしくは生物学的活性のいくつかを本質的に保持することができる。PSEアンタゴニストは、例えば、PSEなどの細胞膜成分の代謝カスケードの上流または下流エレメントとの競合的結合により、あるいは、細胞

膜を介した化合物の輸送を媒介するPSEと結合し、これによってトランスロケーションを阻害することにより、天然に存在するPSE形態の1以上の活性を阻害することができる。

【0143】

別の実施形態では、PSE相同体は、PSEアゴニストまたはPSEアンタゴニスト活性に関して、PSEの突然変異体、例えば、切断型突然変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより、同定することができる。一実施形態では、コンビナトリアル突然変異誘発により核酸レベルでPSE変異体の多様性ライブラリーを産生した後、これを多様性遺伝子ライブラリーによりコードする。PSE変異型の多様性ライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素連結することにより、潜在的PSE配列の縮重セットを個々のポリペプチドとして、あるいは、このPSE配列セットを含むさらに大きな融合タンパク質のセット（例えば、ファージディスプレイのための）として、発現させることができる。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的PSE相同体のライブラリーを産生するのに用いることができる多数の方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成をDNA合成装置において実施した後、合成遺伝子を、適した発現ベクターに連結することができる。遺伝子の縮重セットを用いることにより、潜在的PSE配列の所望のセットをコードする全配列を混合物中に提供することができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成方法は、当業者には公知である [例えば、Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakuraら (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraら (1984) Science 198:1056; Ikeら (1983) Nucleic Acids Res. 11:477を参照]。

【0144】

さらに、PSE断片のライブラリーを用いて、PSE断片の多様性集団を産生し、PSEの相同体のスクリーニングおよび後の選択に使用することができる。一実施形態では、二本鎖の切断が、1分子につき約1回しか発生しない条件下で、ヌクレアーゼでPSEコード配列の二本鎖PCR断片を処理し、二本鎖DNAを変性し、二本鎖DNA（二本鎖切断を有する様々な産物のセンス／アンチセンス対を包含する）の形成で、上記DNAを再生し、新しく形成された二重らせんから一本鎖部分を除去し

た後、得られた断片ライブラリーを発現ベクターと連結することにより、コード配列の断片のライブラリーを産生することができる。この方法により、様々な大きさのPSEのN末端、C末端および内部断片をコードする発現ライブラリーを誘導することができる。

【0145】

点突然変異または切断により産生されたコンビナトリアルライブラリー中の遺伝子産物をスクリーニングする技法、ならびに、選択した特性を有する遺伝子産物のcDNAライブラリーをスクリーニングする技法は、当業者には多数知られている。これらの技法は、PSE相同体のコンビナトリアル突然変異誘発により、産生した遺伝子ライブラリーの高速スクリーニングに適応させることができる。ハイスループット分析に付すことができる、大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするのに、最もよく用いられる技法は、通常、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングし、得られたベクターライブラリーで適切な細胞を形質転換した後、所望の活性の検出により、産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現することを含んでなる。逐次全体突然変異誘発 (REM: recursive ensemble mutagenese)、すなわち、ライブラリーにおける機能的突然変異体の頻度を増加させる新規の技法を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用いることにより、PSE相同体を同定することができる [ArkinおよびYourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7811-7815; Delgraveら (1993) Protein Engineering 6 (3): 327-331]。また、前記方法を組み合わせて用いても有利である。

【0146】

酵素、またはそれらをコードする遺伝子の触媒特性を修飾するのに知られている、別の技法は、遺伝子シャッフリング (例えば、WO 97/20078またはWO 98/13487を参照) であり、これは、遺伝子断片の組合せであり、その際、この新しい組合せを、誤ったポリメラーゼ連鎖反応により変異させ、これにより、検定しようとする高い配列多様性を生み出すことができる。しかし、このような手法を用いるための必要条件は、得られた遺伝子多様性を、機能性について試験するのに適したスクリーニング系である。

【0147】

PUFA依存性酵素活性を同定するスクリーニング方法は、特に、エロンガーゼ活性をスクリーニングするための必要条件である。PUFAに対する特異性を有するエロンガーゼ活性については、毒性代謝物（ここでは、サリチル酸またはサリチル酸誘導体）の存在下でアラキドン酸の毒性をケカビ属 (*Mucor*) 種に用いて、これを、公知の形質転換方法 (Eroshinら、*Mikrobiologiya*, Vol. 65, No. 1, 1996, pp. 31-36) により、所望の遺伝子構築物で形質転換することにより、増殖に基づく一次スクリーニングを実施することができる。こうして得られたクローンを、ガスクロマトグラフィーおよび質量分析法により、脂質成分について分析し、出発材料および産物の種類および量を同定することができる。

【0148】

さらに別の実施形態では、細胞に基づくアッセイを用いて、当業者には公知のさらに別の方法により、多様性PSEライブラリーを分析することも可能である。

【0149】

さらに別の実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチド、またはそのようなタンパク質の一部、例えば、エピトープと特異的に結合する抗体に関する。本発明の抗体を用いて、他のエロンガーゼ、特に、PSEを同定および単離することができる。これらの抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体または合成抗体、ならびに、例えば、Fab、FvまたはscFVフラグメントなど、上記抗体のフラグメントでよい。モノクローナル抗体は、例えば、初めKohlerおよびMilsteinによって、*Nature* 256 (1975)、485に、また、Galfroによって*Meth. Enzymol.* 73 (1981) に記載されているような方法によって産生することができる。抗体およびそのフラグメントは、例えば、HarlowおよびLane, "Antibodies, a Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988に従って調製することもできる。これらの抗体を用いて、例えば、本発明のタンパク質を沈降および局在化させる、あるいは、例えば、組換え生物における該タンパク質の合成をモニターする、ならびに、本発明のタンパク質と相互作用する化合物を同定することもできる。多くの場合、抗体と抗原との結合は、他のリガンドとアンチリガンドとの結合と同等である。

【0150】

本発明はさらに、エロンガーゼ、特に、PSEのアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法であって、

- a) 本発明のポリペプチドを発現する細胞に候補物質を接触させ；
 - b) PSE活性を試験し；
 - c) そのPSE活性を、候補物質の非存在下での標準活性と比較する、
- ことを含んでなり、その際、標準より高いPSE活性は、その候補物質がアゴニストであることを示し、標準活性より低いPSE活性は、候補物質がアンタゴニストであることを示す、上記方法に関する。

【0151】

前記候補物質は、化学的に合成される、または微生物学的に生産される物質でよく、例えば、植物、動物もしくは微生物の、例えば、細胞抽出物に存在するものでよい。前記物質はまた、当業者には公知のものでよいが、PSEの活性を増加または抑制することはこれまで知られていなかった。反応混合物は、無細胞抽出物でもよいし、細胞または細胞培養物を含んでいてもよい。好適な方法は、当業者には公知であり、例えば、Alberts, *Molecular Biology of the cell*、第3版(1994)の例えば、第17章に概要が記載されている。前記物質は、例えば、反応混合物もしくは培養培地に添加することが、または、細胞に注入することが、あるいは、植物に噴霧することができる。

【0152】

本発明の方法により、活性な物質を含むサンプルが同定された場合には、もとのサンプルから該物質を直接単離する、または、例えば、それが多数の異なる成分から構成されているときは、サンプルを様々なグループに分けて、1サンプル当たりの異なる物質の数を減らした後、もとのサンプルのこのような「サブサンプル」を用いて、本発明の方法を繰り返す。サンプルの複雑さに応じて、上記段階を複数回繰り返すが、本発明の方法により同定されるサンプルが、少数の物質または1種の物質しか含まなくなるまで、繰り返すのが好ましい。本発明の方法により同定される物質、またはその誘導体をさらに配合することにより、それらを、植物栽培または植物細胞もしくは組織培養における使用に適したも

のにする。

【0153】

本発明の方法により同定および試験することができる物質として、下記のもの
が挙げられる：発現ライブラリー、例えば、cDNA発現ライブラリー、ペプチド、
タンパク質、核酸、抗体、小さい有機物質、ホルモン、PNAなど (Milner, Natur
e Medicin 1 (1995)、879-880; Hupp, Cell. 83 (1995)、237-245; Gibbs, Ce
ll. 79 (1994)、193-198およびそこで引用された文献)。これらの物質は、公
知の阻害剤またはアクチベーターの機能的誘導体もしくは類似体であってもよい。
化学的誘導体もしくは類似体を生産する方法は、当業者には公知である。従来
の方法を用いて、既知の誘導体もしくは類似体を試験することができる。さらに
、コンピュータ援用設計またはペプチド模擬物を用いて、好適な誘導体もしくは
類似体を生産することも可能である。本発明の方法に用いられる細胞または組織
は、前記実施形態で説明したように、本発明の宿主細胞、植物細胞または植物組
織であるのが好ましい。

【0154】

従って、本発明はまた、前述した本発明の方法により同定された物質にも関す
る。この物質は、例えば、本発明のPSEの相同体である。PSEの相同体は、例えば
、PSEの点突然変異または欠失により、産生することができる。ここで用いる用
語「相同体」とは、PSE活性に対するアゴニストまたはアンタゴニストとして働
くPSEの変異形態を意味する。アゴニストは、PSEの生物学的活性と実質的に同じ
もの、もしくはその一部分を有していてもよい。PSEのアンタゴニストは、天然
に存在するPSEの形態をした1以上の活性を阻害し、例えば、脂肪酸合成の代謝
経路の下流または上流メンバー (PSEを含む) と競合的に結合する、あるいは、P
SEと結合して、進行中の活性を低減または阻害することができる。

【0155】

従って、本発明はまた、本明細書に記載したように、本発明のPSEの活性を阻
害する抗体またはそのフラグメントに関する。

【0156】

本発明の一態様は、本発明の前記アゴニストもしくはアンタゴニストを特異的

に認識する、または結合する抗体に関する。

【0157】

さらに別の態様は、本発明の方法により同定された上記抗体、停止またはアンチセンス分子を含む組成物に関する。

【0158】

E. 本発明に従う使用およびプロセス／方法

本明細書に記載する核酸分子、タンパク質、タンパク質相同体、融合タンパク質、抗体、プライマー、ベクターおよび宿主細胞は、以下に挙げる方法の1つ以上に用いることができる：ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、クリプトコジニウム属 (*Crypthecodinium*)、エキビヨウキン属 (*Phytophthora infenstan s*) またはヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) および関連する生物、ツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、エキビヨウキン属 (*Phytophthora*)、クリプトコジニウム属 (*Crypthecodinium*) またはヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) と関連する生物のゲノムマッピング、目的とするツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、エキビヨウキン属 (*Phytophthora*)、クリプトコジニウム属 (*Crypthecodinium*) またはヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) の同定および局在化、進化研究、当該機能に必要な PSE タンパク質領域の決定、PSE 活性のモジュレーション；1 以上の細胞膜成分の代謝のモジュレーション；1 以上の化合物の膜透過輸送のモジュレーション、ならびに、ファインケミカルのような所望の化合物の細胞による生産のモジュレーション。本発明の PSE 核酸分子は、多様な用途を有する。上記 PSE 核酸分子はまず、ツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、エキビヨウキン属 (*Phytophthora*)、クリプトコジニウム属 (*Crypthecodinium*) もしくはヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*)、またはこれらに近縁の系統として、生物を同定するのに用いることができる。また、上記核酸分子を用いて、微生物の混合集団におけるツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、クリプトコジニウム属 (*Crypthecodinium*)、エキビヨウキン属 (*Phytophthora*) またはヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) もしくはこれらの近縁系統を同定することができる。本発明は、一連のツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、エキビヨウキン属 (*Phytophthora*)、クリプトコジニウム属 (*Crypthecodinium*) またはヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) 遺伝子の核酸配列を提供する

。この生物の存在または非存在は、ストリンジェントな条件下で、微生物の均質または混合集団の培養物の抽出ゲノムDNAをスクリーニングすることにより、決定することができ、その際、上記生物に特有のツリガネゴケ属(Physcomitrella)、クリプテコジニウム属(Crypthecodinium)、エキビョウキン属(Phytophthora)もしくはヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)遺伝子の領域、またはこの遺伝子の一部分の領域を覆うプローブを用いる。高度不飽和酸の商業的生産のためには、ツリガネゴケ属(Physcomitrella)、クリプテコジニウム属(Crypthecodinium)、エキビョウキン属(Phytophthora)またはヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)自体が用いられている。さらに、特に、得られたPUFAをトリアシルグリセロール画分に組み込もうとする場合、本発明の核酸は、PUFAの生産に、また他の生物においても、適している。

【0159】

さらに、本発明の核酸およびタンパク質分子は、ゲノムの特定領域についてのマーカーとして働くことができる。これら分子は、ゲノムをマッピングするのに適しているだけではなく、ツリガネゴケ属(Physcomitrella)、エキビョウキン属(Phytophthora)、クリプテコジニウム属(Crypthecodinium)またはヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)タンパク質の機能研究にも適している。ツリガネゴケ属(Physcomitrella)、クリプテコジニウム属(Crypthecodinium)、エキビョウキン属(Phytophthora)またはヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)の特定のDNA結合タンパク質が結合するゲノム領域を同定するためには、ツリガネゴケ属(Physcomitrella)、クリプテコジニウム属(Crypthecodinium)、エキビョウキン属(Phytophthora)またはヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)ゲノムを断片化し、例えば、得られた断片をDNA結合タンパク質と一緒にインキュベートすることができる。このタンパク質と結合するものは、さらに、本発明の核酸分子、好ましくは、容易に検出可能なマーカーを用いて、スクリーニングすることができる。このような核酸分子とゲノム断片との結合により、ツリガネゴケ属(Physcomitrella)、エキビョウキン属(Phytophthora)、クリプテコジニウム属(Crypthecodinium)またはヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)のゲノムマップでの断片の局在化が可能になり、これを様々な酵素で繰り返し実施すれば、タンパク質が結合する核酸

配列の迅速な決定が容易に行われる。さらに、本発明の核酸分子は、これら核酸分子が、関連する真菌または藻類におけるゲノムマップの構築用のマーカーとして働くのに、近縁種の配列と十分な相同性を有することができる。

【0160】

本発明のPSE核酸分子は、進化研究、ならびに、タンパク質構造の研究にも適している。本発明の分子が関与する代謝および輸送工程は、多数の原核および真核生物細胞によって使用されている。近縁にある生物の進化度は、本発明の核酸分子の配列と、他の生物由来の類似酵素をコードする配列とを比較することにより決定することができる。従って、このような比較により、配列領域が保存されているもの、保存されていないものの決定が可能になり、酵素機能に必須のタンパク質の領域を決定する上で役立つと思われる。このタイプの決定は、タンパク質工学研究に有用であり、タンパク質が、その機能を欠失せずに、どの程度の突然変異誘発を許容できるのかを知る手がかりを提供することになるだろう。

【0161】

本発明のPSE核酸分子の操作により、野生型PSEに対して、機能が異なるPSEの生産が可能になる。これらタンパク質の効力または活性を高める；これらを通常より多数、細胞に存在させる；あるいは、それらの効力または活性を低下させることが可能である。「効力または活性が高められる」とは、例えば、上記酵素が、本来の酵素より、高い選択性および／または活性、好ましくは、少なくとも10%高い活性、特に好ましくは、少なくとも20%高い活性、極めて好ましくは、少なくとも30%高い活性を有することを意味する。

【0162】

本発明のPSEの修飾が、このような修飾タンパク質を含むファインケミカルの収率、生産および／または生産効率に直接影響を与え得る一連の機構が存在する。ラージスケールでの絨毛虫、藻類または真菌の培養物からのファインケミカルの取得は、細胞が所望の化合物を分泌する場合、有意に改善される。なぜならば、これらの化合物は、培養培地から容易に単離することができるからである（培養細胞のバイオマスからの抽出とは対照的に）。あるいは、細胞が、一種の濃縮機構を備えた特別の細胞小器官中に *in vivo* で化合物を貯蔵する場合には、精製

を改善することができる。PSEを発現する植物では、輸送が増加すると、植物組織および植物器官内での分布が改善されと考えられる。細胞からファインケミカルを膜外へ輸送する輸送体分子の数または活性が増加すると、生産されるファインケミカル（細胞外培地に存在する）の量を増加させることができ、従って、回収および精製を容易にし、また、植物の場合には、分布がより効率的になる。対照的に、1以上のファインケミカルの効率的な過剰生産のためには、好適な生合成経路用の補因子、前駆体分子および中間体量の増加が必要である。炭素源（すなわち、糖）、窒素源（すなわち、アミノ酸、アンモニウム塩）、リン酸塩および硫黄などの栄養素の膜内への輸送に関与する輸送体タンパク質の数および／または活性が増加すると、生合成工程で利用可能な栄養素のあらゆる制限事項が排除されるため、ファインケミカルの生産を改善することができる。PUFAのような脂肪酸や、PUFAを含む脂質は、それ自体が望ましいファインケミカルである。これら化合物の生合成に関与する本発明の1以上のPSEの活性を最適化する、またはその数を増加する、あるいは、これら化合物の分解に関与する1以上のPSEの活性を破壊することにより、繊維毛虫、藻類、植物、真菌、酵母またはその他の微生物における脂肪酸および脂質分子の収率、生産および／または生産効率を改善することができる。

【0163】

同様に、本発明に従う1以上のPSE遺伝子の操作によっても、活性が修飾されたPSEが得られ、この修飾された活性は、藻類、植物、繊維毛虫または真菌に由来する1以上の所望のファインケミカルの生産に間接的に影響を与える。正常な生化学代謝工程により、例えば、多数の老廃物（例えば、過酸化水素およびその他の反応性酸素種）が生産され、これら老廃物は、上記代謝工程を活発に破壊しうる[例えば、パーオキシナイトライトは、チロシン側鎖を硝化し、これによって、活性中心にチロシンを含むいくつかの酵素を不活性化することが知られている；Groves, J.T. (1999) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (2) ; 226-235]。これらの老廃物は、通常排泄されるが、ラージスケールでの発酵生産に用いられる細胞は、1以上のファインケミカルの過剰生産のために最適化されていることから、野生型細胞が通常生産するより、多くの老廃物を生産する。老廃物分子の細胞外

への輸送に関与する本発明の1以上のPSEの活性を最適化することにより、細胞の生存能力を改善すると同時に、効率的な代謝活性を維持することが可能になる。また、所望のファインケミカルが細胞内に多量に存在すると、実際に細胞に対して有毒となる恐れがあるため、該細胞がこれら化合物を分泌する能力を高めることにより、細胞の生存能力を改善することができる。

【0164】

さらに、本発明のPSEを操作して、様々な脂質および脂肪酸分子の相対量を改変することもできる。このことにより、細胞膜の脂質組成に決定的な影響を及ぼしうる。脂質は種類に応じて、それぞれ異なる物理的特性を有するため、膜の脂質組成の改変は、膜の流動性を有意に改変することができる。膜の流動性における変化は、膜を介した分子の輸送に影響を与え、これによって、既に説明したように、老廃物や、生産されたファインケミカルの膜外への輸送、または必要な栄養素の膜内への輸送を改変することができる。このような膜の流動性の変化はまた、細胞統合性にも決定的な影響を及ぼし、比較的弱い膜を有する細胞は、非生物性および生物性ストレス状態を被りやすくなり、これによって、細胞は損傷もしくは死滅することもある。膜合成用の脂肪酸および脂質の生産に関与し、得られた膜が、ファインケミカルの生産に用いられる培養物を占める環境状態を被りやすい膜組成になるようなPSEの場合には、このPSEを操作することによって、より多くの細胞が、生存および増殖できるようにしなければならない。生産細胞の数が多いほど、培養物からのファインケミカルの収率、生産または生産効率が高くなるはずである。

【0165】

ファインケミカルの収率を高くすることを目的とする、PSEに対する上記突然変異誘発戦略は、制限的と解釈すべきではなく、これら戦略の変種は、当業者には容易に明らかである。これら機構を用いて、かつ、本明細書に開示した機構を補助的に使用し、本発明の核酸およびタンパク質分子を用いて、突然変異したPSE核酸分子およびタンパク質分子を発現する、藻類、繊毛虫、植物、動物、真菌もしくは、*C. glutamicum*などその他の微生物を産生し、これにより、所望の化合物の収率、生産および／または生産効率を高くすることができる。この所望の

化合物は、藻類、繊毛虫、植物、動物、真菌または細菌由来のあらゆる天然産物でよく、生合成経路の最終産物、ならびに、天然に存在する代謝経路の中間体、さらには、これら細胞の代謝では天然に存在しないが、本発明の細胞により生産される分子も包含される。

【0166】

本発明のさらに別の実施形態は、PUFAの生産方法であり、この方法は、脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合がある C_{16} -、 C_{18} -または C_{20} -脂肪酸を2炭素原子以上伸長させるポリペプチドをコードする、本発明の核酸、本発明の遺伝子構築物、または本発明のベクターを含有する生物を、PUFAが該生物において産生される条件下で培養することを含んでなる。この方法により生産したPUFAは、これらが成長する培養物、または野生のいずれかに由来する生物を採取し、採取した材料を有機溶剤で破壊および／または抽出することにより、単離することができる。脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、トリアシルグリセロールおよび／またはPUFAをより高い含量で含む遊離脂肪酸を含有する油を、この溶剤から単離することができる。PUFAをより高い含量で含む遊離脂肪酸は、脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質およびトリアシルグリセロールの塩基性または酸性加水分解により単離することができる。より高いPUFA含量とは、本発明のエロンガーゼをコードする追加核酸を含まない本来の生物と比較して、PUFAが少なくとも5%、好ましくは、10%、特に好ましくは、20%、極めて好ましくは、40%多いことを意味する。

【0167】

この方法により生産されるPUFAは、好ましくは、脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合、好ましくは、3、4、5または6個の二重結合、特に好ましくは、3または5個の二重結合がある C_{16} -、 C_{20} -または C_{22} -脂肪酸分子である。これらの C_{16} -、 C_{20} -または C_{22} -脂肪酸分子は、油、脂質または遊離脂肪酸の形態で、生物から単離することができる。好適な生物の例は、前述の通りである。好ましい生物は、微生物、動物または植物、特に好ましくは、植物または藻類、非常に好ましくは、トランスジェニック植物である。

【0168】

本発明の実施形態は、前記方法により調製された油、脂質もしくは脂肪酸またはそれらの画分であり、特に好ましくは、PUFAを含み、かつ、トランスジェニック植物に由来する油、脂質または脂肪酸組成物である。

【0169】

本発明の一実施形態は、本発明の方法により生産された油、脂質または脂肪酸である。本発明の他の実施形態は、本発明の方法により生産されたPUFAを含み、かつ、本発明の核酸、遺伝子構築物またはベクターを含有するトランスジェニック植物に由来する油、脂質または脂肪酸組成物である。

【0170】

本発明のさらに別の実施形態は、飼料、食物、化粧品または医薬品における上記油、脂質または脂肪酸組成物の使用である。

【0171】

本発明のさらに別の実施形態は、本発明の核酸、本発明の遺伝子構築物、本発明のアミノ酸配列、本発明のアンチセンス核酸分子、本発明の抗体および／または組成物、本発明の方法により産生されたアンタゴニストもしくはアゴニスト、および／または、本発明の脂質および／もしくは脂肪酸、あるいはそれらの画分を含む、キットに関する。このキットはまた、本発明の宿主細胞、生物もしくは植物、またはそれらの部分、採取することができる本発明の植物部分、または増殖物質、あるいは、本発明のアンタゴニストまたはアゴニストを含んでもよい。本発明のキットの成分は、例えば、バッファーもしくはその他の溶液と一緒に、またはそこに導入して、適当な容器に充填することができる。1以上の前記成分を同一の容器に充填してもよい。さらに、あるいは、上記に代わり、1以上の前記成分を固体表面、例えば、ニトロセルロースフィルター、ガラスプレート、チップ、ナイロン膜またはマイクロプレート上に吸収させてもよい。このキットは、本明細書に記載した方法および実施形態のすべてに用いることができ、例えば、宿主細胞、トランスジェニック植物の生産、相同的配列の検出、アンタゴニストまたはアゴニストの同定などに用いることができる。さらに、このキットは、上記用途の1つに関し、該キットの使用方法についての指示を含んでもよい。

【0172】

以下に示す実施例により、本発明をさらに詳しく説明するが、これらを制限的なものと解釈するべきではない。本明細書に引用する参考文献、特許出願、特許および公開特許出願のすべての内容は、本明細書に参照として組み込むものとする。

【0173】

実施例実施例1：一般的方法a) 一般的クローニング方法

例えば、制限切断、アガロースゲル電気泳動、DNA断片の精製、ニトロセルロースおよびナイロン膜への核酸の転写、DNA断片の連結、大腸菌および酵母細胞の形質転換、細菌の培養、ならびに、組換えDNAの配列分析などのクローニング方法は、Sambrookら [(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6] またはKaiser, MichaelisおよびMitchell [(1994)、"Methods in Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3] に記載されているように実施した。クロレラ (Chlorella) またはケイ藻 (Phaeodactylum) などの藻類の形質転換および培養は、El-Sheekh [(1999)、Biologia Plantarum 42:209-216] またはAptら [(1996) Molecular and General Genetics 252 (5): 872-9] によって記載されているように実施する。

【0174】

b) 化学物質

本明細書に特に記載のない限り、用いられる化学物質は、Fluka (Neu-Ulm)、Merck (Darmstadt)、Roth (Karlsruhe)、Serva (Heidelberg) およびSigma (Deisenhofen) から、分析グレードの品質のものを取得した。溶液は、Milli-Q水システム水精製ユニット (Millipore, Eschborn) から得た発熱物質を含まない純粋な水 (本書では以後H₂Oと称する) を用いて、調製した。制限エンドヌクレアーゼ、DNA修飾酵素および分子生物学キットは、AGS (Heidelberg)、Amersham (Brunswick)、Biometra (Gottingen)、Boehringer (Mannheim)、Genomed (Bad Oeynhausen)、New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)、Novagen (Madi

son, Wisconsin, USA)、Perkin-Elmer(Weiterstadt)、Pharmacia(Freiburg)、Qiagen (Hilden) およびStratagene (Amsterdam, the Netherlands) から取得した。特に記載のない限り、これらは、製造者の指示に従って使用した。

【0175】

c) 細胞材料

この研究は、American Type Culture Collection (ATCC) から、株番号ATCC26185 (Thraustochytrium) のヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)の株を用いて、また、クリプテコジニウム属(Crypthecodinium)の場合には、Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) West Boothbay Harbour, ME, USA) から、株培養番号CCMP316の株を用いて、実施した。藻類をガラス管中で、25℃の暗所で培養し、そこに、底部から空気を通過させた。このほかに、SinghおよびWard (1997, Advances in Microbiology, 45, 271-311) により詳細に記載されているように、ヤブレッツボカビ(Thraustochytrium)を成長させた。

【0176】

クリプテコジニウム(Crypthecodinium)に用いた培養培地は、Guillard, R.R.L. の10%有機媒質を補充したf/2培養培地であった [1975: Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates: Smith, W.L.およびChanley, M.H. (編) Culture of marine Invertebrate animals, NY Plenum Press, pp. 29-60]。これは、下記を含む：

995.5 mlの(人工)塩水、

1 mlの NaNO_3 (75 g/l)、1 mlの NaH_2PO_4 (5 g/l)、1 mlの微量金属溶液

、

1 mlのTris/Cl (pH 8.0)、0.5 mlのf/2ビタミン溶液、

微量金属溶液： Na_2EDTA (4.36 g/l)、 FeCl_3 (3.15 g/l)、

主要微量金属： CuSO_4 (10 g/l)、 ZnSO_4 (22 g/l)、 CoCl_2 (10 g/l)

、 MnCl_2 (18 g/l)、 NaMoO_4 (6.3 g/l)、

f/2ビタミン溶液：ビオチン：10 mg/l、チアミン200 mg/l、ビタミンB12 0.1 mg/l、

有機媒質：酢酸ナトリウム (1 g / l)、グルコース (6 g / l)、コハク酸ナトリウム (3 g / l)、バクトートリプトン (4 g / l)、酵母エキス (2 g / l)

d) コケ材料 (=植物材料)

この研究のために、ハンブルグ大学の遺伝子研究学部の収集物から、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) (Hedw.) B.S.G.種の植物を用いた。これらは、ハンティンドン州 (英国) グランズデンウッドのH.L.K. Whitehouseにより収集され、胞子からEngel (1968, Am J Bot 55, 438-446) により継代培養された株16/14に由来する。胞子を用いて、配偶体を再生することにより、植物を繁殖させた。原糸体は、単相胞子から、葉緑体が豊富なクロロネーマ (chloronema) と、葉緑体が欠失したコーロネーマ (caulonema) に発達させ、これらは、約12日後に発芽した。これらの芽は、造精器と造卵器を有する配偶子団 (gametophore) に成長した。受精により、短い柄と、中で還元胞子が成熟する莢膜とを有する二倍体胞子体が発生した。

【0177】

e) 植物培養物

植物を下記の条件下で、制御された環境の培養室において生育した：気温25℃、光度55 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (白色光：Philips TL 65W/25蛍光管)、ならびに、光/暗所領域が16/8時間。コケは、ReskiおよびAbelの改変Knop培地 (1985, Plant a 165, 354-358) を用いた液体培地、または1%オキシド寒天 (Unipath, Basingstoke, England) の固形Knop培地のいずれかで生育した。

【0178】

RNAおよびDNAの単離に用いる原糸体を、通気した液体培地中で生育した。この原糸体を9日毎に粉碎した後、新鮮な培地に移した。

【0179】

f) フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*) の培養

初めに、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*) のcDNAライブラリーを作製した。このために、American Type Culture Collection (Rockville, USA) から株ATCC 48886を取得することができる。株ATCC 48886について

記載した培養プロトコルの変法として、フィトフトラ (*Phytophthora*) 胞子を常温の二回蒸留水で洗浄し、冷蔵庫に6時間保存して、胞子形成を誘導した。次に、上記材料をエンドウ培地に移した。このために、150 gの急速冷凍エンドウ (Ig¹ u、地元のスーパーマーケットで入手可能) を無菌条件下で、1リットルの水を用いて、20分オートクレーブ処理した。オービタルシェーカー (200 rpm) を用いて、材料を100 ml¹ フラスコ中で室温にて生育した。2日後、2つのフラスコをろ過し、乳鉢と乳棒を用いてフィルター上の残留物を液体窒素中で粉砕した後、4日間にわたり、両フラスコの各々について、上記手順を繰り返した。

【0180】

実施例2：ハイブリダイゼーション実験用の植物ならびにヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) およびクリプテコジニウム属 (*Crypthecodinium*) などの微生物からの全DNAの単離

全DNAの単離に関する詳細は、新鮮重量が1グラムの植物材料の調製 (work-up) を参照されたい。

【0181】

CTABバッファー：2% (w/v) 臭化N-アセチル-N,N,N-トリメチルアンモニウム (CTAB) ; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA。

【0182】

N-ラウリルサルコシンバッファー：10% (w/v) N-ラウリルサルコシン; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM EDTA。

【0183】

植物材料、または、クリプテコジニウム属 (*Crypthecodinium*) もしくはヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) 細胞材料を、乳鉢内の液体窒素下において粉砕することにより、微粉を取得し、これを2 ml¹ エッペンドルフ容器に移した。次に、凍結植物材料を1 ml¹ の分解バッファー層 (1 ml¹ CTABバッファー、100 ml¹ N-ラウリルサルコシンバッファー、20 ml¹ β メルカプトエタノールおよび10 ml¹ プロテイナーゼK溶液、10 mg/ml¹) に浸し、連続的に振盪しながら、60℃で1時間インキュベートした。得られたホモジネートを2つのエッペンドルフ容器 (2 ml¹) に分配し、等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を用いて、振盪

しながら2回抽出した。相分離のために、それぞれについて、 $8000 \times g$ およびRT (=室温=約23℃)で、遠心分離を15分実施した。次に、氷冷イソプロパノールを用いて、DNAを -70°C で30分沈殿させた。沈殿したDNAを 4°C および $10,000 \text{ g}$ で30分沈降させた後、180 mlのTEバッファー中で再懸濁させた (Sambrookら、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)。さらに精製するため、DNAをNaCl (1.2 M最終濃度)で処理した後、2倍量の無水エタノールを用いて、 -70°C で30分再度沈殿させた。70%エタノールを用いた洗浄段階の後、DNAを乾燥させてから、50 mlの H_2O +RNase (50 mg/ml最終濃度)中に入れた。DNAを 4°C で一晩溶解させた後、RNase切断を 37°C で1時間実施した。こうして得られたDNAを 4°C で保存した。

【0184】

実施例3：植物および微生物（クリプテコジニウム属(Cryptocodium)およびヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)からの全RNAおよびポリ(A)⁺-RNAの単離

Logemannら (1987, Anal. Biochem. 163, 21) により記載された方法で、全RNAをアマニおよびアブラナなどの植物から単離した。コケからの全RNAを原糸体からGTC法を利用して取得した (Reskiら、1994、Mol. Gen. Genet., 244: 352-359)。

【0185】

クリプテコジニウム属(Cryptocodium)およびヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)からのRNAの単離：

藻類の凍結サンプル (-70°C) を液体窒素下の氷冷乳鉢中で粉砕する。2容量の均質化培地 (12.024 gのソルビトール、40.0 mlの1M Tris-HCl、PH 9 (0.2 M) ; 12.0 mlの5 M NaCl (0.3 M) 、8.0 mlの250 mM EDTA、761.0 mgのEGTA、40.0 mlの10% SDSを H_2O と一緒に、200 mlになるまで調製し、pHを8.5にする) と、0.2%メルカプトエタノールを含む4容量のフェノールとを十分に混合しながら、 $40\sim 50^{\circ}\text{C}$ で、上記凍結細胞粉末に添加する。次に、2容量のクロロホルムを添加し、混合物を15分激しく攪拌した。得られた混合物を $10,000 \text{ g}$ で10分遠心分離した後、フェノール/クロロホルム (2容量/2容量)、次に、クロロホルムを用いて、水相を抽出する。

【0186】

こうして得られた水相の全量を、1/20容量の4 M酢酸ナトリウム (pH 6) と1容量の(氷冷) イソプロパノールで処理した後、核酸を-20℃で沈降させる。混合物を10,000 gで30分遠心分離し、上清を吸入により除去する。この後、70% EtOHでの洗浄段階と、もう1回の遠心分離段階が続く。沈殿物をトリスホウ酸バッファー (80 mM トリスホウ酸バッファー、10 mM EDTA、pH 7.0) 中に溶解させる。次に、上清を1/3容量の8 M LiClで処理し、混合した後、4℃で30分インキュベートする。遠心分離の後、沈降物を70%エタノールで洗浄し、遠心分離に付してから、沈降物を、RNaseを含まない水に溶解させる。

【0187】

ポリ(A)⁺-RNAは、Dyna Beads (登録商標) (Dyna1, Oslo, Finland) を用いて、製造者のプロトコルにある指示に従って単離する。

【0188】

RNAまたはポリ(A)⁺-RNA濃度を決定した後、1/10容量の3 M酢酸ナトリウム (pH 4.6) と2容量のエタノールを添加することにより、RNAを沈降させ、-70℃で保存する。

【0189】

分析のために、ホルムアルデヒドを含有する1.5%濃度アガロースゲル中で、20 μ g部のRNAを分離し、ナイロン膜 (Hybond, Amersham) に転写する。Amasino (1986) Anal. Biochem. 152, 304) の記載に従い、特定の転写物を検出する。

【0190】

ヒメツリガネゴケ (Physcomitrella patens) からの全RNAおよびポリ(A)⁺-RNAの単離：

RNeasy Plant Total RNAキット (Quiagen, Milden) と、そこに含まれるバッファーを用いて、製造者の指示に従い、全RNAを取得した。こうして得られた全RNAから、Promega (Heidelberg) 製のRNA単離システムIIIのPoly ATtract (登録商標) を用いて、製造者の指示に従い、ポリ(A)⁺-RNAを単離した。

【0191】

実施例4：cDNAライブラリーの構築

ツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、クリプテコジニウム属 (*Cryptocodium*) およびヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) から、それぞれ、cDNAライブラリーを構築するために、マウス白血病ウイルス逆転写酵素 (Roche, Mannheim, Germany) と、オリゴ-d(T)プライマーを用いて、第1鎖合成を実施すると同時に、DNAポリメラーゼI、すなわち、クレノウ酵素と一緒にインキュベートした後、RNase Hを用いて、12℃で2時間、16℃で1時間および22℃で1時間切断することにより、第2鎖合成を実施した。65℃でのインキュベーション (10分) により、反応を停止した後、氷に移した。37℃で (30分)、T4DNAポリメラーゼ (Roche, Mannheim) を用いて、二本鎖DNA分子を平滑末端にした。フェノール/クロロホルム、およびSephadex G50スピンカラムを用いた抽出により、ヌクレオチドを除去した。T4 DNAリガーゼ (Roche、12℃、一晚) を用いて、EcoRI/XhoIアダプター (Pharmacia, Freiburg, Germany) をcDNA末端に連結した後、XhoIで再切断し、ポリヌクレオチドキナーゼ (Roche、37℃、30分) を用いたインキュベーションによりリン酸化した。この混合物を低融点アガロースゲル上で分離に付した。300を超える塩基対からなるDNA分子をゲルから溶離し、フェノールで抽出し、Elutip Dカラム (SchleicherおよびSchüll, Dassel, Germany) で濃縮させ、ベクターアームに連結した後、ギガバックゴールド (Gigapack Gold) キット (Stratagene, Amsterdam, the Netherlands) を用いて、製造者の材料を使用し、かつ、製造者の指示に従い、λ-ZAPIIファージまたはλ-ZAP-発現ファージにパッケージングした。

【0192】

フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*) のcDNAライブラリーの構築は、上記のように実施した。

【0193】

実施例5：DNA配列決定およびコンピュータ解析

実施例4に記載したcDNAライブラリーを用いて、標準的方法、特に、ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Germany) を用いた連鎖終止反応法により、DNAの配列決定を実施した。cDNAライブラリーからプラスミドを調製した後、in vivo大量除去に続き

、寒天プレート上でのDH10Bの再形質転換により、個々のランダムクローンを配列決定した（材料およびプロトコルについての詳細：Stratagene, Amsterdam, the Netherlands）。Qiagen DNA調製ロボット（Qiagen, Hilden）を用いて、製造者のプロトコルに従い、アンピシリンを補充したLuria培地（Sambrookら（1989）（Cold Spring Harbor Laboratory Press：ISBN 0-87969-309-6）を参照）中で一晩生育した大腸菌培養物から、プラスミドDNAを調製した。下記のヌクレオチド配列を有する配列決定用プライマーを用いた：

5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3'

5' -CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3'

5' -TGTAACGACGGCCAGT-3'

【0194】

配列をプロセッシングし、Bio-Max (Munich, Germany) から市販されているEST-MAX標準ソフトウェアパッケージを用いて、記録した。比較アルゴリズムを利用し、検索用配列を用いて、相同遺伝子を検索し、BLASTプログラム (Altschulら (1997) " Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" , Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) を使用した。ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) エロンガーゼの検索用配列と相同性を有するクリプテコジニウム属 (*Cryptocodium*) およびヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) からの1配列をさらに詳しく分析した。

【0195】

実施例6a：ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) Pp PSE1遺伝子との比較による、Tc PSE1およびTc PSE2遺伝子 (Tc=*Thraustochytrium*) およびCc PSE1およびCc PSE2遺伝子 (Cc=*Cryptocodium cohnii*) の同定

TBLASTN検索アルゴリズムによる配列比較には、本発明のPp PSE1コケエロンガーゼの全長配列（名称についても、表2を参照）を用いた：

```
MEVVERFYGE LDGKVSQGVN ALLGSFGVEL TDTPTTKGLP LVDSPTPIVL GSVVYLTIVI
GGLLWIKARD LKPRASEPFL LQALVLVHNL FCFALSLYMC VGIAYQAITW RYSLWGNAYN
PKHKEMAILV YLFYMSKYVE FMDTVIMILK RSTRQISFLH VYHHSSISLI WWAIAHHAPG
```


GEAYWSAALN SGVHVLMYAY YFLAACLRSS PKLKNKYLFW GRYLTQFQMF QFMLNLVQAY
YDMKTNAPYP QWLIKILFYF MISLLFLFGN FYVQKYIKPS DGKQKGAKTE.

【0196】

コケエロンガーゼPp_PSE1 cDNAの完全ヌクレオチド配列は、約1,200 bpから構成される。これは、計算分子量が33.4 Daである、290アミノ酸をコードする873 bpのオープンリーディングフレームを含んでいる。該タンパク質配列は、酵母において鎖長が中程度の脂肪酸の伸長に必要な、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)遺伝子産物、例えば、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)PSE1遺伝子産物に対して、38.5%の同一性および48.5%の類似性しか有しない (TokeおよびMartin, 1996, Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 271, 18413-18422)。

【0197】

ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)エロンガーゼ、PSE1遺伝子との相溶性が初め低かった (表2参照) ことから、候補遺伝子の中でも、EST配列CC001042041R、TC002034029RおよびTC002014093Rをまず標的遺伝子とみなした。図5は、Pp_PSE1ペプチド配列と、みいだされた配列との比較の結果を示す。これは、本発明の配列番号3の核酸 (遺伝子名: TcPSE1、発明者のデータベースNo. TC002034029R) の部分である。文字は、同一のアミノ酸を示すのに対し、+の記号は、化学的に類似したアミノ酸を表している。本発明に従ってみいだされた配列すべての同一性および相溶性については、表3に概要を示す。

【0198】

クローンTC002034029R由来の完全cDNA断片の配列決定により、オープンリーディングフレームにおいて、第1塩基で開始する693塩基対の配列が得られた。この配列は、塩基対位置586~588で、配列番号3から翻訳された塩基対位置に停止コドンを含む配列番号4に示した195アミノ酸のポリペプチドをコードする。クローンTC002014093Rは、図7の配列アライメントからわかるように、実質的に完全なエロンガーゼポリペプチドを含む。線は、同一のアミノ酸を示し、また、コロンおよび点は、化学的に交換可能な、すなわち、化学的に同等のアミノ酸を

表す。アラインメントは、Heinkoff & Heinkoff's BLOSUM62アミノ酸置換マトリックスを用いて、実施した((1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919)。用いたパラメーターは次の通りである：ギャップ加重が8；平均マッチが2.912、長さ加重が2、平均ミスマッチが-2.003。

【0199】

さらに、配列アライメントにより第2 ESTを同定した。みいだされた配列を有する Pp_PSE1ペプチド配列のアライメントを図6に示す。選択されたパラメーターの中で、相同性が、数アミノ酸に制限されているとしても、これは、PUFA特異的エロンガーゼの高度に保存された領域を意味する。従って、完全クローン化断片の配列を決定した。

【0200】

クローンTC002014093Rの完全cDNA断片の配列決定により、オープンリーディングフレームにおいて第1塩基で開始する955塩基対の配列が得られた。この配列を、本発明において配列番号5と呼ぶ。この配列は、本発明の配列番号6に示した塩基対位置892~894に停止コドンを含む297アミノ酸のポリペプチドをコードする。

【0201】

Cc_PSE1遺伝子をコードする海洋渦鞭毛藻(*Cryptothecodinium cohnii*) EST CC001042041Rを、配列PpPSE1を用いて、同定した。単離されたEST CC001042041Rは、本発明において配列番号7として示されるが、これは、長さが708塩基対で、214アミノ酸をコードする第1塩基から642塩基対のオープンリーディングフレームを有し、位置643~645に停止コドンを含む。停止コドンまでのアミノ酸配列は、本発明において配列番号8として示す。

【0202】

PSE1遺伝子産物との類似性以外にも、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)エロンガーゼ (sce elo 1P) との類似性も保存することができ (TokeおよびMartin, 1996, Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biolo

gical Chemistry 271, 18413-18422)、この類似性は、酵母において、鎖長が中程度の脂肪酸の伸長に必要とされる。表3は、本発明のエロンガーゼ同士の、ならびに、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) および酵母エロンガーゼとの、同一性および相同性を示す。データは、ソフトウェア: Wisconsin Package Version 10.0 (Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc., USA) のサブプログラムとしてGAPプログラムを用いて、得られた。

【0203】

【表3】

同一性/ 相同性	Tc_PSE1	Tc_PSE2	Pp_PSE1	Sce elo 1P
Cc_PSE1	47.1% / 40.2%	50.6% / 43.5%	38.5% / 29.4%	45.1% / 33.5%
Tc_PSE1	100 / 100	n.d.	43.2% / 32.7%	41.9% / 29.9%
Tc_PSE2	41.7% / 29.5%	100 / 100	39.2% / 30.0	35.4% / 27.8%

【0204】

特に、図5～10を用いて、相同性の高い領域として次の配列モチーフを誘導することができ、そこから誘導された対応する共通配列は、アミノ酸を3塩基対コドンへと逆翻訳することにより、オリゴヌクレオチドを産生し、これを利用して、ポリメラーゼ連鎖反応により新たなエロンガーゼを単離することができる。これらは、特に、図10に示した配列モチーフである。これらモチーフを用いて、オリゴヌクレオチドを誘導することができ、これを、2つのオリゴヌクレオチドと組み合わせて、PCR実験で使用するすることにより、別のエロンガーゼ断片を単離することができる。このためには、通常規定された5' -3' 鎖とマッチする1つのオリゴヌクレオチドと、下流の3' -5' 鎖とマッチするオリゴヌクレオチドを有する第2のものを構築および合成するのが好都合である。これによって、限定可能な数のプライマーの組合せを生じるが、これは、考えられる変異型の順列 (permutation) により制限される。

【0205】

この場合、オリゴdTプライマーおよびその変異型を用いることもでき、例えば、最後の塩基は、例えば、オリゴdT (12-20) X (ここで、Xは、G、CまたはTでよい) のような転写物プールに対する特異性を可能にする。また、第2塩基オリゴdT (12-20) XY (ここで、Xは、G、CまたはAでよく、Yは、A、G、CまたはTでよい) を用いてもよい。

【0206】

前述の配列によって、17から20量体オリゴヌクレオチドを誘導することが可能になり、これを用いて、温度プログラム、Mgイオン濃度などの実験パラメーターを変えることにより、遺伝子断片を単離することができる。こうして得られた断片を適当なベクターにクローニングし、得られたクローンの配列を、新しいエロンガーゼを同定するための既存の方法により決定することができる。

【0207】

実施例6b: フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*) からの cDNA クローンの単離

ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) (ATCCC 48886) からの PUFA エロンガーゼに対する相同性を用いて、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*) 由来の、PI001002014R と称する cDNA クローンを、ランダムに配列決定した cDNA から同定した。上記クローンは、図8に示す共通モチーフ MyxYYF を含んでおり、そこで、これまでに同定してきた PUFA エロンガーゼとは違って、可変アミノ酸 x としてトレオニン基が認められた。このさらなる変異を用いて、PCR プライマーを誘導することができる。

【0208】

実施例7: ハイブリダイゼーションによる遺伝子の同定 (TC002034029R-11 iGen Tc-PCE1)

遺伝子配列を用いて、cDNA ライブラリーまたはゲノムライブラリーから、相同または異種遺伝子を同定することができる。

【0209】

相同遺伝子 (すなわち、相同的または相同体である全長 cDNA クローン) は、例えば、cDNA ライブラリーを用いた核酸ハイブリダイゼーションにより単離するこ

とができる。尚、この方法を用いて、特に、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の、機能的に活性な全長遺伝子を単離することができる。目的とする遺伝子の頻度に応じて、100,000から1,000,000組換えバクテリオファージを培養し、ナイロン膜に移す。アルカリによる変性の後、例えば、UV架橋によりDNAを膜の上に固定化する。高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを実施する。イオン強度が1 M NaCl、温度68℃の水溶液中でハイブリダイゼーションおよび洗浄段階を実施する。例えば、放射性 (^{32}P -) ニック転写を用いた標識付け (High Prime, Roche、ドイツ、マンハイム) により、ハイブリダイゼーションプローブを産生した。オートラジオグラフィーによりシグナルを検出した。

【0210】

低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を用いて、前記方法と同様に、近縁ではあるが、同一ではない、部分的に相同または異種の遺伝子を同定できる。水性ハイブリダイゼーションのために、イオン強度を通常1 M NaClに維持し、温度を68℃から42℃へと徐々に下げた。

【0211】

例えば、10~20アミノ酸の個々のドメインに関する相同性しか示さない遺伝子の単離は、合成、放射性同位元素標識オリゴヌクレオチドプローブを用いて、実施することができる。放射性同位元素標識オリゴヌクレオチドは、T4ポリヌクレオチドキナーゼで、2つの相補的オリゴヌクレオチドの5' 末端をリン酸化することにより、産生する。相補的オリゴヌクレオチドをハイブリダイズし、互いに連結することにより、コンカテマーを産生する。二本鎖コンカテマーを例えば、ニック転写により、放射性同位元素標識する。ハイブリダイゼーションは、通常、オリゴヌクレオチド高濃縮物を用いて、低ストリンジェンシー条件下で実施する。

【0212】

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション溶液：

6 × SSC

0.01 M リン酸ナトリウム

1 mM EDTA (pH 8)

0. 5% SDS

100 μ g/ml 変性サケ精子DNA

0.1% 低脂肪粉ミルク

【0213】

ハイブリダイゼーションの間、温度を、計算されたオリゴヌクレオチド温度より5～10℃低い温度または室温（特に記載のない限り、すべての実験で、室温＝23℃前後）まで段階的に下げた後、洗浄段階およびオートラジオグラフィーを実施する。洗浄は、極めて低いストリンジェンシーで実施され、例えば、4×SSCを用いて、3回実施する。さらに詳しくは、下記に記載されている：Sambrook, J. ら (1989) “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press、もしくはAusubel, F.M. ら (1994) “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons。

【0214】

遺伝子名がTc_PCE1_1のクローンTC002034029R-11は、ヤブレッツボカビ属 (Thraustochytrium) 由来のエロンガーゼの全長配列であり、従って、配列番号3および配列番号4由来のクローンTC002034029Rより長い。クローンは、前述（実施例7）のように、ハイブリダイゼーション方法を用いて、単離した。これは、271アミノ酸をコードする、長さが1,050塩基対のDNA配列であり、塩基対位置43～45に開始コドン、また塩基対位置856～858に停止コドンを有する。

【0215】

実施例8：抗体を用いた発現ライブラリーのスクリーニングによる標的遺伝子の同定

cDNA配列を用いて（例えば、Qiagen QIAexpress pQE系）、例えば、大腸菌において、組換えタンパク質を産生する。次に、通常、Ni-NTAアフィニティークロマトグラフィー (Qiagen) により、組換えタンパク質をアフィニティー精製する。そして、組換えタンパク質を用いて、例えば、ウサギを免疫する標準的技法に従い、特定の抗体を誘導する。次に、Guらにより、(1994) BioTechniques 17: 257-262に記載されているように、組換え抗原で予め飽和させたNi-NTAカラムを

用いて、抗体をアフィニティー精製する。得られた抗体を用いて、免疫スクリーニングにより、発現cDNAライブラリーをスクリーニングできる (Sambrook, J.ら (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press、もしくはAusubel, F.M.ら (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons)。

【0216】

実施例9：植物形質転換用のプラスミド

植物形質転換には、pBinARのようなバイナリーベクターを用いることができる (HofgenおよびWillmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230)。バイナリーベクターは、センスまたはアンチセンス配向のcDNAをT-DNAに連結することにより、構築することができる。cDNAの5' 側にある植物プロモーターは、cDNA転写を活性化する。ポリアデニル化配列は、cDNAの3' 側に位置する。

【0217】

組織特異的発現は、組織特異的プロモーターを用いて、達成することができる。例えば、種子特異的発現は、cDNAの5' 側のnapinまたはLeB4またはUSPプロモーターにおけるクローニングにより達成することができる。その他のどんな種子特異的プロモーターエレメントを用いてもよい。あらゆる植物における構成的発現に、CaMV-35Sプロモーターを用いることができる。

【0218】

発現されたタンパク質は、例えば、色素体、ミトコンドリアまたは小胞体用のシグナルペプチドを用いて、細胞コンパートメントにターゲッティングすることができる (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423)。シグナルペプチドをcDNAと適正なリーディングフレームにおいて5' 側にクローニングすることにより、融合タンパク質の細胞下局在を達成する。

【0219】

実施例10：アグロバクテリウムの形質転換

アグロバクテリウム媒介による植物形質転換は、例えば、アグロバクテリウム ツメファシエンス株GV3101 (pMP90) (KonczおよびScheil, Mol. Gen. Genet. 204 (1986) 383-396) またはLBA4404 (Clontech) を用いて、実施することができ

る。形質転換は、標準的形質転換方法 (Deblaereら、Nucl. Acids. Res. 13 (1985), 4777-4788) により実施することができる。

【0220】

実施例11：植物の形質転換

アグロバクテリウム媒介による植物形質転換は、標準的形質転換および再生方法を用いて、実施することができる (Gelvin, Stilton B., Schilperoort, Robert A., Plant Molecular Biology Manual、第2版、Dordrecht : Kluwer Academic Publ., 1995, Sect., Ringbuc Zentrale Signatur : BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton : CRC Press, 1993, 360 pp. ISBN 0-8493-5164-2)。

【0221】

例えば、子葉または胚軸 (hypocotyledon) 形質転換 (Moloneyら、Plant Cell Report 8 (1989) 238-242; De Blockら、Plant Physiol. 91 (1989) 694-701) により、アブラナを形質転換することができる。アグロバクテリウムおよび植物の選択のための抗体の使用は、形質転換に用いるバイナリーベクターおよびアグロバクテリウム株に応じて違ってくる。アブラナの選択は、通常、選択植物マーカーとしてカナマイシンを用いて実施する。

【0222】

アマニ (*Linum usitatissimum*) におけるアグロバクテリウム媒介による遺伝子導入は、例えば、Mlynarovaら (1994) Plant Cell Report 13 : 282-285により記載された技法を用いて、実施することができる。

【0223】

ダイズの形質転換は、例えば、EP-A-0 424 047 (Pioneer Hi-Bred International) またはEP-A-0 397 687、米国特許第5,376,543号、米国特許第5,169,770号 (トレド大学) に記載された技法を用いて、実施することができる。

【0224】

粒子ボンバードメント、ポリエチレングリコール媒介DNA取込みを用いた、あるいは、シリコンカーボネートファイバー技法による植物形質転換については

、例えば、FreelingおよびWalbot (“The maize handbook” (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York) により記載されている。

【0225】

実施例12：植物形質転換用のプラスミド

植物形質転換には、pBinARのようなバイナリーベクターを用いることができる (HofgenおよびWillmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230) 。バイナリーベクターは、センスまたはアンチセンス配向のcDNAをT-DNAに連結することにより構築することができる。cDNAの5' 側の植物プロモーターは、cDNA転写を活性化する。ポリアデニル化配列は、cDNAの3' 側に位置する。組織特異的発現は、組織特異的プロモーターを用いて達成することができる。例えば、種子特異的発現は、cDNAの5' 側のナピン (napin) またはLeB4またはUSPプロモーターへのクローニングにより達成することができる。その他のどんな種子特異的プロモーターエレメントを用いてもよい。あらゆる植物における構成的発現に、CaMV-35Sプロモーターを用いることができる。特に、エロンガーゼおよびデサチュラーゼをコードする遺伝子は、複数の発現カセットを連続して構築し、植物における代謝経路を模擬することにより、バイナリーベクターにクローニングすることができる。

【0226】

発現カセット内で、発現したタンパク質は、例えば、色素体、ミトコンドリアまたは小胞体用のシグナルペプチドを用いて、細胞コンパートメントにターゲティングすることができる (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423) 。シグナルペプチドをcDNAと適正なリーディングフレームにおいて5' 側にクローニングすることにより、融合タンパク質の細胞下局在を達成する。

【0227】

実施例13：in vivo突然変異誘発

微生物のin vivo突然変異誘発は、大腸菌またはその他の微生物 (例えば、バチルス属、もしくはサッカロミセス・セレビシエのような酵母) を用いて、プラスミドDNA (またはその他のベクターDNA) を継代し、そこで、それらの遺伝情報の全体性を保持する能力を破壊することにより、実施することができる。通常の

ミューテーター株は、DNA修復系用の遺伝子に突然変異を有する（例えば、mutHL S、mutD、mutTなど；参照として、Rupp, W.D. (1996) DNA repair mechanism: *Escherichia coli* and *Salmonella*, pp. 2277-2294, ASM: ワシントンを参照）。これらの株は、当業者には公知である。これらの株の使用については、例えば、Greener, A.およびCallahan, M. (1994) *Strategies* 7: 32-34に説明されている。突然変異したDNA分子は、微生物を選択および試験した後、植物に転移するのが好ましい。本明細書の実施例の節にある様々な実施例に従い、トランスジェニック植物を産生する。

【0228】

実施例14：形質転換した生物における組換え遺伝子産物の発現の研究

形質転換した宿主生物における組換え遺伝子産物の活性を、転写および／または翻訳レベルで測定した。

【0229】

遺伝子の転写量（これは、当該遺伝子産物の翻訳に使用可能なRNAの量を意味する）を決定するのに適した方法は、以下に記載するようなノーザンブロットを実施することである（参照として、Ausubelら (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: ニューヨーク、または前記の実施例の項を参照）。その際、プライマーは、目的とする遺伝子と結合して、検出可能な標識（通常、放射能または化学発光）で標識されるように設計されており、これにより、生物の培養物の全RNAを抽出し、ゲル上で分離し、安定マトリックスに移行させた後、このプローブと一緒にインキュベートする。上記プローブの結合および結合範囲が、上記遺伝子のmRNAの存在および量を示す。この情報から、形質転換した遺伝子の転写度がわかる。全細胞RNAは、細胞、組織または器官から、多数の方法によって調製することができ、これら方法のすべては、当業者には公知であり、例えば、Bormann, E.R.ら (1992, *Mol. Microbiol.* 6: 317-326) の方法がある。

【0230】

ノーザンハイブリダイゼーション：

RNAハイブリダイゼーションのために、Amasino (1986, *Anal. Biochem.* 152, 304) により記載されるようにホルムアルデヒドを用いて、1.25%強度アガロー

スゲルにおけるゲル電気泳動により、 $20\mu\text{g}$ の全RNAまたは $1\mu\text{g}$ のポリ(A)⁺-RNAを分離し、 $10\times\text{SSC}$ を用いた毛管吸引により、正に荷電したナイロン膜 (Hybond N⁺、Amersham、フランスウィック) に移行させ、紫外線で固定化した後、ハイブリダイゼーションバッファー (10%硫酸デキストランw/v、1 M NaCl、1 % SDS、100 mgニシン精子DNA) を用いて、 68°C で3時間、プレハイブリダイズした。DNAプローブは、 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ (Amersham、ドイツ、フランスウィック) を用いて、プレハイブリダイゼーション段階中に、ハイプライム (Highprime) DNA標識キット (Roche、ドイツ、マンハイム) で標識しておいた。標識したDNAプローブを同じバッファー中に 68°C で一晩添加した後、ハイブリダイゼーションを実施した。 68°C で、 $2\times\text{SSC}$ を用いて15分を2回、 $1\times\text{SSC}$ 、1 % SDSを用いて30分を2回の洗浄段階を実施した。密封されたフィルターを -70°C で1~14日の間露光させた。

【0231】

ウェスタンブロット (例えば、Ausubelら (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: ニューヨークを参照) のような標準的方法を用いて、このmRNAにより翻訳されたタンパク質の存在または相対量を調べることができる。この方法では、全細胞タンパク質を抽出し、ゲル電気泳動により分離し、ニトロセルロースのようなマトリックスに移した後、所望のタンパク質と特異的に結合する抗体のようなプローブと一緒にインキュベートする。このプローブには、通常、容易に検出が可能な化学発光または比色分析標識を施す。観察された標識の存在および量は、細胞に存在する所望の突然変異タンパク質の存在および量を示す。

【0232】

実施例15: 所望の産物の生産に及ぼす組換えタンパク質の影響の分析

植物、真菌、藻類、絨毛虫における、または所望の化合物 (脂肪酸など) の生産に対する遺伝子改変の影響は、適した条件 (前述したものなど) 下で、改変微生物または改変植物を生育させ、所望の産物 (すなわち、脂質または脂肪酸) の生産増加について培地および/または細胞成分を分析することにより、決定することができる。これらの分析方法は、当業者には公知であり、分光学、薄層クロ

マトグラフィー、各種染色方法、酵素および微生物学的方法、ならびに、高性能液体クロマトグラフィーのような分析クロマトグラフィーが挙げられる（例えば、Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A2, PP. 89-90および pp. 443-613, VCH Weinheim (1985) ; Fallon, A.ら (1987) " Applications of HPLC in Biochemistry" ; Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 17 ; Rehmら (1993) Biotechnology、第3巻、第III章、" Product recovery and purification" , pp. 469-714, VCH Weinheim ; Belter, P .A.ら (1988) Bioseparations : downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons ; Kennedy, J.F.、ならびに、Cabraal, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons ; Shaeiwitz, J .A.およびHenry, J.D. (1988) Biochemical separations : Ullmann' s Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3 ; 第11章、第1-27巻、VCH Weinheim ; ならびに、Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications) 。

【 0 2 3 3 】

前記の方法の他に、Cahoonら (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22) : 12935-12940、ならびに、Browseら (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145に記載されているように、植物材料から植物脂質を抽出する。定量および定性脂質または脂肪酸分析については、下記に記載されている : Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/スコットランド : Oily Press (Oily Press Lipid Library ; 2) ; Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland : Oily Press, 1989, Repr. 1992 , IX, 307 pp. (Oily Press Lipid Library ; 1) ; " Progress in Lipid Research, Oxford : Pergamon Press, 1 (1952) -16 (1977) 題名 : Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN。

【 0 2 3 4 】

発酵の最終産物を測定する以外に、所望の化合物を生産するのに用いられる代謝経路の他の成分（中間体および副産物など）を分析することにより、化合物の全体生産効率を決定することも可能である。分析方法としては、培地の栄養素量

(例えば、糖、炭水化物、窒素源、リン酸イオンおよびその他のイオン)の測定、バイオマス組成および成長測定、生合成経路の通常の代謝物の生産の分析、ならびに、発酵中に発生したガスの測定などが挙げられる。これら測定の標準的方法については、下記に記載されている: Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes および P.F. Stanbury 編、IRL Press, pp. 131-163 および 165-192 (ISBN: 0199635773) ならびに、そこに引用されている参考文献。

【0235】

一例は、脂肪酸の分析である (略語: FAME、脂肪酸メチルエステル; GC-MS、気液クロマトグラフィー/質量分析法; TAG、トリアシルグリセロール; TLC、薄層クロマトグラフィー)。

【0236】

脂肪酸産物の存在の明白な検出は、標準的分析方法: GC、GC-MS または TLC により、組換え生物を分析することにより、達成することができ、これらの方法は、Christie により、またその引用参考文献に、幾度も記載されている (1997: Advances on Lipid Methodology、第4版: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, gas chromatography/mass spectrometry methods, Lipide 33:343-353)。

【0237】

分析しようとする材料は、音波破碎、ガラスミルでの磨碎、液体窒素および粉碎、あるいは、その他の適用可能な方法により破碎することができる。破碎後、材料を遠心分離しなければならない。沈降物を蒸留水中に再懸濁させ、100℃で10分加熱し、氷冷して再遠心分離させた後、2%ジメトキシプロパンを含むメタノール中の0.5 M硫酸において90℃で1時間抽出する。これにより、加水分解された油および脂質化合物が得られ、これは、メチル基転移脂質をもたらす。これらの脂肪酸メチルエステルを石油エーテルで抽出し、最終的に、毛管カラム (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 μ m, 0.32 mm) を用いて170~240℃を20分の温度勾配および240℃で5分のGC分析を実施する。得られた脂肪酸メチルエステルの正体は、市販されている標準溶液 (すなわち、Sigma) を用い

て、決定しなければならない。

【0238】

使用できる標準溶液がない脂肪酸については、誘導体化の後、GC/MS分析を実施することにより、その正体を証明しなければならない。例えば、三重結合を有する脂肪酸の局在化は、4,4-ジメトキシオキサゾリン誘導体 (Christie, 1998, 前記参照) を用いた誘導体化の後GC/MSにより証明しなければならない。

【0239】

実施例16：異種微生物系における発現構築物

株、生育条件およびプラスミド

大腸菌株XL1 Blue MRF⁺ kan (Stratagene) を用いて、PpPSE1のような新規のヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) エロンガーゼをサブクローニングする。この遺伝子を機能的に発現するため、サッカロミセス・セレビスエ菌株IN VSc 1 (Invitrogen Co.) を用いた。ルリアーベルティニブロス (LB, Duchefa、オランダ、ハールレム) において、大腸菌を37℃で培養する。必要であれば、アンピシリン (100 mg/リットル) を添加し、1.5%の寒天 (w/v) を添加して、固体LB培地を得る。サッカロミセス・セレビスエ菌を、YPG培地、またはウラシルを含まない完全最少培地 (CMDm; Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.B., Cohen, D.M.およびVarki, A. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons、ニューヨーク) のいずれかにおいて、2% (w/v) のラフィノースまたはグルコースのいずれかと一緒に、30℃で培養する。固体培地を得るために、2% (w/v) のBacto (商標登録) 寒天 (Difco) を添加する。クローニングおよび発現に用いるプラスミドは、pUC18 (Pharmacia) および pYES2 (Invitrogen Co.) である。

【0240】

実施例17：PUFA特異的ツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*)、クリプテコジニウム属 (*Cryptocodinium*) およびヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) エロンガーゼのクローニングおよび発現

本発明に従う配列の全長遺伝子は、実施例7に記載したように単離し、以下に

説明するようにプロセッシングすることができる。具体的な発現例を使用に関して示す。

【0241】

A) コケ植物エロンガーゼPp_PSE1による脂肪酸の伸長：

酵母における発現のために、PUFA特異的エロンガーゼ (PSE1) 遺伝子をコードする、ヒメツリガネゴケ (*P. patens*) cDNAクローンPpPSE1 (初期データベース配列名：08_ck19_b07、新名称：pp001019019f) をまず修飾することにより、BamHI制限部位と、高度に効果的な翻訳のための酵母コンセンサス配列 (Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, Cell 44, 283-292) が開始コドンの次に得られ、かつ、停止コドンに隣接するBamHI制限部位が得られるようにした。オープンリーディングフレームを増幅するために、5' および3' 末端と相補的なプライマー対を合成した。

【0242】

配列番号1示した本発明に従う配列の遺伝子は、ポリメラーゼ連鎖反応により、pYESにクローニングされ、これによって、プラスミドpYPp_PSE1が生じる。

【0243】

下記のオリゴヌクレオチドをPCR実験に用いた：

Ppex6: ggatccacataatggaggtcgtggagagattc
Ppex6r: ggatcctcactcagtttttagctccttttgc

サーモサイクラー (Biometra) 中で、マトリックスとしてクローンPP001019019FのプラスミドDNAを用いて、Pfu DNA (Stratagene) ポリメラーゼおよび下記の温度プログラムで、PCR反応を実施した：96℃で3分の後、96℃で30秒、55℃で30秒および72℃で1分を25サイクル、そして72℃で10分を1サイクル。

【0244】

適正サイズの増幅DNA断片をアガロースTBEゲル電気泳動により確認した。QIAquickゲル抽出キット (QIAGEN) を用いて、増幅DNAをゲルから抽出し、初めに、シュアクローン連結キット (Sure Clone Ligation Kit) (Pharmacia) を用いて、pUC18にクローニングした。このようにしてクローニングした断片をBamHIで切

断し、pYESに連結することにより、pYpp_PSE1を得た。断片の配向をHindIIIにより確認した。大腸菌XL1 Blue MRF⁺ kanの形質転換の後、形質転換体のDNAミニプレップ (Riggs, M.G.およびMcLachlan, A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparation. BioTechniques 4, 310-313) を実施し、陽性クローンをBamHI制限分析により同定した。ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Warrington) を用いた再配列決定により、クローン化PCR産物の配列を確認した。

【0245】

Nucleobond (登録商標) AX 500プラスミドDNA抽出キット (Macherey-Nagel, Düren) を用いて、1クローンを生育し、DNAマキシプレップを実施した。

【0246】

対照として、改変PEG/酢酸リチウムプロトコル (Ausubelら、1995) を用いて、酵母菌INVSc1をpYpp_PSE1またはpYES2で形質転換した。2%グルコースを含むCMDm-寒天プレート上での選択後、すでに述べたように、さらなる培養および機能発現のために形質転換体およびpYES2形質転換体を選択し、培地に様々な脂肪酸を供給した。

【0247】

i) 断片挿入なしにpYESプラスミドで形質転換した、もしくは、250 μ mヘキサデカトリエン酸 (16:3 $\Delta^7c, 10c, 13c$) を供給した後、Pp-PSE1遺伝子を発現する酵母の脂質パターン (データの単位はモル%)

【表4】

PYES2	PYES2	pYpp_PSE1	pYpp_PSE1
16:0	11.8%	16:0	11.1%
16:1	28.7%	16:1	23.9%
16:3 $\Delta^7c, 10c, 13c$	9.2%	16:3 $\Delta^7c, 10c, 13c$	12.0%
18:0	10.6%	18:0	8.6%
18:1 Δ^9c	34.9%	18:1 Δ^9c	20.6%
18:1 Δ^{11c}	1.1%	18:1 Δ^{11c}	1.4%
18:3 $\Delta^9c, 12c, 15c$	3.7%	18:3 $\Delta^9c, 12c, 15c$	21.4%

【0248】

ii) 断片挿入なしにpYESプラスミドで形質転換した、もしくは、500 μ mピノレン酸 (18:3 $\Delta^{6c, 9c, 12c}$) を供給した後、Pp-PSE1遺伝子を発現する酵母の脂質パターン (データの単位はモル%)

【表5】

PYES2	PYES2	pYPp_PSE1	PYPp_PSE1
16:0	18.3%	16:0	16.9%
16:1 Δ^{9c}	16.0%	16:1 Δ^{9c}	15.3%
18:0	8.6%	18:0	8.4%
18:1 Δ^{9c}	16.7%	18:1 Δ^{9c}	17.5%
18:1 Δ^{11c}	0.7%	18:1 Δ^{11c}	2.0%
18:3 $\Delta^{6c, 9c, 12c}$	39.8%	18:3 $\Delta^{6c, 9c, 12c}$	32.6%
20:3 $\Delta^{7c, 11c, 14c}$	0%	20:3 $\Delta^{7c, 11c, 14c}$	5.1%

【0249】

iii) 断片挿入なしにpYESプラスミドで形質転換した、もしくは、500 μ mステアリドン酸 (18:4 $\Delta^{6c, 9c, 12c, 15c}$) を供給した後、Pp-PSE1遺伝子を発現する酵母の脂質パターン (データの単位はモル%)

【表6】

PYES2	pYES2	pYPp_PSE1	PYPp_PSE1
16:0	15.2%	16:0	15.6%
16:1 Δ^{9c}	13.1%	16:1 Δ^{9c}	14.9%
18:0	12.3%	18:0	10.7%
18:1 Δ^{9c}	12.9%	18:1 Δ^{9c}	14.0%
18:1 Δ^{11c}	0.7%	18:1 Δ^{11c}	1.2%
18:3 $\Delta^{6c, 9c, 12c, 15c}$	45.4%	18:3 $\Delta^{6c, 9c, 12c, 15c}$	23.8%
20:4 $\Delta^{8c, 11c, 14c, 17c}$	0.4%	20:4 $\Delta^{8c, 11c, 14c, 17c}$	19.8%

【0250】

iv) 断片挿入なしにpYESプラスミドで形質転換した、もしくは、500 μ mリノール酸 (18:2 $\Delta^{9c, 12c}$) を供給した後、Pp-PSE1遺伝子を発現する酵母の脂質パターン (データの単位はモル%)

【表7】

pYES2	pYES2	pYpP_PSE1	PYPp_PSE1
16:0	7.9%	16:0	8.7%
16:1 ^{Δ9c}	1.2%	16:1 ^{Δ9c}	1.3%
18:0	5.3%	18:0	5.1%
18:1 ^{Δ9c}	1.3%	18:1 ^{Δ9c}	1.3%
18:2 ^{Δ9c,12c}	83.9%	18:2 ^{Δ9c,12c}	80.4%
20:2 ^{Δ11c,14c}	0.5%	20:2 ^{Δ11c,14c}	3.2%

【0251】

B) ヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) エロンガーゼによる脂肪酸の伸長:

酵母における発現のために、PUFA特異的エロンガーゼ (PSE) 遺伝子をコードする配列番号3 (Tc_PSE2) のヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) cDNAクローンを初めに修飾し、それが機能的に活性なポリペプチドを構成するようにする。このために、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) エロンガーゼからのいくつかの欠失した (missing) 塩基によって、該タンパク質のN末端をDNAレベルで42塩基対伸長する。しかし、配列の適正リーディングフレームに開始コドンを加えるだけでもよい。

【0252】

下記のオリゴヌクレオチドをPCR実験に用いる:

pTCPSE2-5':

aaaggatccacataatggaggtcgtggagagattctacgggtgagttggatggga
agGTCATTTCCGGCCCTCGACC

pTCPSE2-3': aaggatccctgagtttttagctcccttttgctttcc

【0253】

さらに、両オリゴヌクレオチドは、BamHI制限部位と、高度に効率的な翻訳のための酵母コンセンサス配列 (Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, Cell 44, 283-292) を含む。

【0254】

サーモサイクラー (Biometra) 中で、マトリックスとしてプラスミドDNAを用いて、Pfu DNA (Stratagene) ポリメラーゼおよび下記の温度プログラムで、PCR反応を実施した: 96℃で3分の後、96℃で30秒、55℃で30秒および72℃で3分を

25サイクル、72℃で10分を1サイクル、そして4℃で停止。

【0255】

適正サイズの増幅DNA断片をアガロースTBEゲル電気泳動により確認する。QIAquickゲル抽出キット (QIAGEN) を用いて、増幅DNAをゲルから抽出し、シュアクローン連結キット (Sure Clone Ligation Kit) (Pharmacia) を用いて、脱リン酸ベクターpUC18のSmaI制限部位に連結することにより、pUC-ハイブリッド-Tc^r-PSE2を作製した。大腸菌XL1 Blue MRF⁺ kanの形質転換に続き、24アンピリシン耐性形質転換体のDNAミニプレップ (Riggs, M.G.およびMcLachlan, A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparation. BioTechniques 4, 310-313) を実施し、陽性クローンをBamHI制限分析により同定した。ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) を用いた再配列決定により、クローン化PCR産物の配列を確認した。

【0256】

pUC-PSE1およびpUC-ハイブリッド-Tc^r-PSE2のプラスミドDNAをまずBamHIで切断し、得られた断片を脱リン酸酵母/大腸菌シャトルベクターpYES2のBamHI制限部位に連結し、pY2-ハイブリッド-Tc^r-PSE2を作製した。

【0257】

大腸菌の形質転換および形質転換体からのDNAミニプレップに続き、ベクターにおけるDNA断片の配向をHindIIIでの切断により確認した。Nucleobond (登録商標) AX 500プラスミドDNA抽出キット (Macherey-Nagel, Düringen) を用いて、1クローンを生育し、DNAマキシプレップ (maxiprepation) を実施した。改変PEG/酢酸リチウムプロトコル (Ausubelら、1995) を用いて、酵母菌INVSc1をpY2PSE1、pYES2、pY2-ハイブリッド-Tc^r-PSE2およびpYES2で形質転換する。2%グルコースを含むCMDm寒天プレート上での選択後、次の培養および機能的発現のために、各ケースで、4つのpY2PSE1形質転換体 (pY2PSE1a-d)、pY2-ハイブリッド-Tc^r-PSE2形質転換体 (pY2-ハイブリッド-Tc^r-PSE2 1a-d) および1つのpYES2形質転換体を選択した。

【0258】

酵母におけるエロンガーゼ活性の機能的発現

前培養物：

2 % (w/v) ラフィノースを含む20 mlのCMDum液体培地にトランスジェニック酵母クローン (pY2-ハイブリッド-Tc_PSE2 1a-d、pYES2) を接種し、600 nm (OD_{600}) での光学濃度が1.5~2に達するまで、30℃および200 rpmで3日間培養した。

【0259】

主培養物：

発現のために、2 % ラフィノースと1 % (v/v) Tergitol NP-40を含む20 mlのCMDum液体培地に、脂肪酸基質を補充して、最終濃度を0.003% (w/v) とした。この培地に、上記前培養物を0.05の OD_{600} へ接種した。2 % (w/v) ガラクトースを用いて、0.2の OD_{600} で16時間発現を誘導し、その直後に、該培養物を0.8~1.2の OD_{600} で回収した。

【0260】

脂肪酸分析：

脂肪酸全体を酵母培養物から抽出し、ガスクロマトグラフィーにより分析した。このため、5 mlの培養物の細胞を遠心分離 ($1,000 \times g$, 10分、4℃) により回収し、100 mM NaHCO_3 、pH 8.0で1回洗浄して、残留培地および脂肪酸を除去した。脂肪酸メチルエステル (FAME) を調製するために、細胞沈降物を、1 Mメタノール性 H_2SO_4 および2 % (v/v) ジメトキシプロパンで、80℃にて1時間処理した。このFAMEを2 mlの石油エーテルで2回抽出し、100 mM NaHCO_3 、pH 8.0で1回洗浄し、蒸留水で1回洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。アルゴン流の下で、有機溶剤を蒸発させ、上記FAMEを50 μl の石油エーテルに溶解させた。フレイムイオン化検出器を備えたヒューレットパッカード6850ガスクロマトグラフ内のZEBRON ZB Wax毛管カラム (30m、0.32 mm、0.25 μm ; Phenomenex) 上で、上記サンプルを分離した。オープン温度は、20℃/分の昇温速度で、70℃ (1分間保持する) から200℃まで、次に、5℃/分の速度で、250℃ (5分間保持する) まで、最後に、5℃/分の速度で、260℃までプログラムした。窒素をキャリアーガス (70℃で4.5 ml/分) として用いた。脂肪酸は、FAME標準物 (SIGMA) の保持時

間との比較により同定した。

【0261】

5種類のトランスジェニック酵母株の脂肪酸パターンをモル%で表1に示す。

【0262】

添加し、摂取させた γ -リノレン酸の割合は太字で印刷した数により強調し、伸長産物の割合は赤い数で、また、伸長 γ -リノレン酸の割合は太字で印刷した数（最後の行）によって、それぞれ示す。

【0263】

pYES2 (i/対照) と、pY2PSE1 (ii~iv c+d/それぞれ、pY2PSE1A、pY2PSE1B、pY2PSE1C、pY2PSE1Dで形質転換) で形質転換した酵母の全脂質を形成するFAMEのGC分析を図2a-eに示す。分析のために、トランスジェニック酵母を γ -18:3の存在下で培養した。表1は、それらの脂肪酸パターンをモル%で示す。 γ -18:3の摂取は太字で印刷した数により強調し、伸長産物ジホモ γ -リノレン酸 (20:3 Δ 8、11、14) には下線を引き、 γ -18:3伸長産物の割合（これもモル%）は太字で印刷した数（最後の行）により強調する。シス- Δ 6、9、12 C18:3のDMOX誘導体の構造および質量スペクトルは、図3 a+bからわかる。また、 Δ 8、11、14 C20:3のDMOX誘導体の構造および質量スペクトルについては、図4 a+bを参照されたい。

【0264】

以上の結果から、 γ -18:3が、すべてのトランスジェニック酵母に多量に組み込まれたことが明らかになった。pY2PSE1で形質転換された4つのトランスジェニック酵母クローンはすべて、ガスクロマトグラムにおいて別のピークを呈示し、これは、保持時間の比較により、20:3 Δ 8、11、14として同定された。ガスクロマトグラフィー/質量分光学により、この正体を確認する証明をさらに得ることができる。表1に示すように、伸長された γ -18:3の百分率は、23.7~40.5%であった。さらに、パルミチン酸 (16:0)、パルミトレイン酸 (16:1)、ステアリン酸 (18:0) またはオレイン酸 (18:1 Δ 9) の有意な伸長は認められなかった。

【0265】

同定された産物から、PpPSE1のヌクレオチド配列が、コケ植物ヒメツリガネコケ (*Physcomitrella patens*) 由来の $\Delta 6$ -選択的脂肪酸エロンガーゼをコードし、これによって、トランスジェニック酵母において新規の脂肪酸の形成が起こることが明らかになった。

【0266】

添加および摂取された脂肪酸基質の割合は上記のように決定することができ、その結果エロンガーゼ反応の量および質を検出することができる。

【0267】

また、DMOX誘導体の構造および質量スペクトルから、二重結合の各位置がわかる。

【0268】

非常に多様なその他の脂肪酸（例えば、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸など）を用いた供給実験を実施して、このエロンガーゼの基質選択性をさらに詳細に確認することができる。

【0269】

実施例18：形質転換生物からの所望の産物の単離の概要

所望の産物は、当業者には公知の各種方法により、植物材料または真菌、藻類、絨毛虫、動物細胞から、または前記培養物の上清から、所望の産物を取得することができる。所望の産物が細胞から分泌されない場合には、低速遠心分離により、培養物から細胞を回収し、機械力または音波破碎などの標準的技法により、細胞を溶解させることができる。植物の器官を他の組織または他の器官から機械的に分離することができる。ホモゲナイズの後、遠心分離により、細胞破壊屑を除去し、可溶性タンパク質を含む上清画分を残して、所望の化合物をさらに単離する。産物が所望の細胞から分泌される場合には、低速遠心分離により、培養物から細胞を除去し、上清画分を残して、さらなる単離を実施する。

【0270】

各単離段階から得た上清画分は、適当な樹脂を含むクロマトグラフィーに付す。所望の分子は、クロマトグラフィー樹脂に残るのに対し、サンプル中の多くの不純物は残らないか、あるいは、樹脂上に不純物は残るが、所望の分子は残らな

いかのいずれかである。これらのクロマトグラフィー段階は、必要に応じ、同じまたは他のクロマトグラフィー樹脂のいずれかを用いて、繰り返すことができる。当業者であれば、好適なクロマトグラフィー樹脂の選択や、単離しようとする特定の分子の最も効果的な使用について、熟知している。単離された産物は、ろ過または限外ろ過により濃縮し、産物の安定性が最も高い温度で保存することができる。

【0271】

非常に多様な単離方法が当業者には知られており、前述した単離方法は、制限を意図するものではない。これらの単離方法は、例えば、Bailey, J.E.およびOllis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill; ニューヨーク (1986) に記載されている。

【0272】

単離した化合物の正体（素性）および純度は、当業者には公知の標準的技法により決定することができる。このような技法として、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、分光法、染色法、薄層クロマトグラフィー、NIRS、酵素アッセイまたは微生物法が挙げられる。これらの分析方法については、下記を参照されたい：Patekら (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 133-140; Malakhovaら (1996) *Biotekhnologiya* 11: 27-32; ならびに、Schmidtら (1998) *Bioprocess Engineer.* 19: 67-70. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (1996) Vol. A27, VCH Weinheim, pp. 89-90, pp. 521-540, pp. 540-547, pp. 559-566, pp. 575-581およびpp.581-587; Michal, G (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley and Sons; Fallon, A.ら (1987) *Applications of HPLC in Biochemistry: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 17。

【0273】

均等物

当業者であれば、通常の実験を行うだけで、本明細書中にこれまで述べてきた本発明の特定の実施形態についての多数の均等物を知っているか、あるいは、特定することができる。これらの均等物は、本発明の特許請求の範囲に含まれるも

のである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、酵母e101ペプチド（上列）とヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) PpPSE1とのアライメントを示す。

【図2】

図2 a～eは、それぞれ、pYES2対照、pY2PSE1A、pY2PSE1B、pY2PSE1C、pY2PSE1Dで形質転換した酵母の全脂質からのFAMEのGC分析を示す。

【図3】

図3 aおよびbは、それぞれ、シス- Δ 6、9、12 C18 : 3のDMOX誘導体の構造および質量スペクトルを示す。

【図4】

図4 aおよびbは、それぞれ、シス- Δ 8、11、14 C20 : 3のDMOX誘導体の構造および質量スペクトルを示す。

【図5】

図5は、Pp_PSE1ペプチド配列とTc_PSE1ペプチド配列との比較を示す。

【図6】

図6は、Pp_PSE1ペプチド配列とTc_PSE2ペプチド配列との比較を示す。

【図7】

図7は、Pp_PSE1ペプチド配列とCc_PSE1ペプチド配列との比較を示す。

【図8】

図8は、Pp_PSE1ペプチド配列とTc_PSE2ペプチド配列とのアライメントを示す。

【図9】

図9は、Cc_PSE1ペプチド配列とTc_PSE2ペプチド配列とのアライメントを示す。

【図10】

図10は、Pp_PSE1、Tc_PSE1、Tc_PSE2およびCc_PSE1ペプチド配列の配列モチーフを示す。

【配列表】

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> New Elongase gene and a process for the production of
polyunsaturated fatty acids

<130> 0050/51159

<140> 20000081

<141> 2000-02-09

<160> 12

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1192

<212> DNA

<213> Physcomitrella patens

<220>

<221> CDS

<222> (58)..(930)

<400> 1

ctgcttcgtc tcattctggg ggtgtgattc gggagtggtg tgagttggtg gagcgca	57
atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag ttg gat ggg aag gtc tcg	105
Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser	
1 5 10 15	
cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt ggg gtg gag ttg acg gat	153
Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp	
20 25 30	
acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt gac agt ccc aca ccc atc	201
Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile	
35 40 45	
gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att gtc att gga ggg ctt ttg	249
Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu	
50 55 60	
tggtataaag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc gcc tcg gag cca ttt ttg	297
Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu	
65 70 75 80	

ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg ttc tgt ttt gcg ctc agt	345
Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser	
85 90 95	
ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag gct att acc tgg cgg tac	393
Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr	
100 105 110	
tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa cat aaa gag atg gcg att	441
Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile	
115 120 125	
ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac gtg gaa ttc atg gat acc	489
Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr	
130 135 140	
gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg caa ata agc ttc ctc cac	537
Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His	
145 150 155 160	
gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att tgg tgg gct att gct cat	585
Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His	
165 170 175	
cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct gcg gct ctg aac tca gga	633
His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly	
180 185 190	
gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc ttg gct gcc tgc ctt cga	681
Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg	
195 200 205	
agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt ttt tgg ggc agg tac ttg	729
Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu	
210 215 220	
aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg aac tta gtg cag gct tac	777
Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr	
225 230 235 240	
tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca caa tgg ctg atc aag att	825
Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile	
245 250 255	
ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt ctt ttc ggc aat ttt tac	873
Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr	
260 265 270	

gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga aag caa aag gga gct aaa 921
 Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
 275 280 285

act gag tga gctgtatcaa gccatagaaa ctctattatg ttagaacctg 970
 Thr Glu
 290

aagtgggtgc tttcttatct ccacttatct ttttaagcagc atcagttttg aaatgatgtg 1030

tgggcgtggt ctgcaagtag tcatcaatat aatcggcctg agcacttcag atggattgtt 1090

agaacatgag taaaagcggg tattacgggtg tttattttgt accaaatcac cgcacgggtg 1150

aattgaata tttcagattt gatcaatttc atctgaaaaa aa 1192

<210> 2

<211> 290

<212> PRT

<213> Physcomitrella patens

<400> 2

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
 1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
 20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
 35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
 50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
 85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
 100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
 115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr

130	135	140
Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His		
145	150	155 160
Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His		
	165	170 175
His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly		
	180	185 190
Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg		
	195	200 205
Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu		
	210	215 220
Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr		
	225	230 235 240
Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile		
	245	250 255
Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr		
	260	265 270
Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys		
	275	280 285
Thr Glu		
290		

<210> 3
 <211> 687
 <212> DNA
 <213> Thraustochytrium

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(588)

<400> 3
 cgc agc gtg cat aac ctc ggg ctc tgc ctc ttc tcg ggc gcc gtg tgg 48
 Arg Ser Val His Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp
 1 5 10 15
 atc tac acg agc tac ctc atg atc cag gat ggg cac ttt cgc agc ctc 96

Ile Tyr Thr Ser Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu	
20 25 30	
gag gcg gca acg tgc gag ccg ctc aag cat ccg cac ttc cag ctc atc	144
Glu Ala Ala Thr Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile	
35 40 45	
agc ttg ctc ttt gcg ctg tcc aag atc tgg gag tgg ttc gac acg gtg	192
Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val	
50 55 60	
ctc ctc atc gtc aag ggc aac aag ctc cgc ttc ctg cac gtc ttg cac	240
Leu Leu Ile Val Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His	
65 70 75 80	
cac gcc acg acc ttt tgg ctc tac gcc atc gac cac atc ttt ctc tcg	288
His Ala Thr Thr Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser	
85 90 95	
tcc atc aag tac ggc gtc gcg gtc aat gct ttc atc cac acc gtc atg	336
Ser Ile Lys Tyr Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met	
100 105 110	
tac gcg cac tac ttc cgc cca ttc ccg aag ggc ttg cgc ccg ctt att	384
Tyr Ala His Tyr Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile	
115 120 125	
acg cag ttg cag atc gtc cag ttc atc ttc agc atc ggc atc cat acc	432
Thr Gln Leu Gln Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr	
130 135 140	
gcc atc tac tgg cac tac gac tgc gag ccg ctc gtg cat acc cac ttt	480
Ala Ile Tyr Trp His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe	
145 150 155 160	
tgg gaa tac gtc acg ccc tac ctc ttc gtc gtg ccc ttc ctc atc ctc	528
Trp Glu Tyr Val Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu	
165 170 175	
ttt ctc aat ttc tac ctg cag cag tac gtc ctc gcg ccc gca aaa acc	576
Phe Leu Asn Phe Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr	
180 185 190	
aag aag gca tag ccacgtaaca gtagaccagc agcgcgagc acgcgtgccg	628
Lys Lys Ala	
195	
cgttatcgcg aagcacgaaa taaagaagat catttgattc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	687

<210> 4

<211> 195

<212> PRT

<213> Thraustochytrium

<400> 4

Arg Ser Val His Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp
 1 5 10 15

Ile Tyr Thr Ser Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu
 20 25 30

Glu Ala Ala Thr Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile
 35 40 45

Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val
 50 55 60

Leu Leu Ile Val Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His
 65 70 75 80

His Ala Thr Thr Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser
 85 90 95

Ser Ile Lys Tyr Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met
 100 105 110

Tyr Ala His Tyr Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile
 115 120 125

Thr Gln Leu Gln Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr
 130 135 140

Ala Ile Tyr Trp His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe
 145 150 155 160

Trp Glu Tyr Val Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu
 165 170 175

Phe Leu Asn Phe Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr
 180 185 190

Lys Lys Ala
 195

<210> 5
 <211> 955
 <212> DNA
 <213> *Thaustochytrium*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (894)

<400> 5
 gtc att tcg ggc ctc gac ctt ctc ccc gtg ctc tcg tgg gag act atg 48
 Val Ile Ser Gly Leu Asp Leu Leu Pro Val Leu Ser Trp Glu Thr Met
 1 5 10 15
 aag ttc gac act gcc gaa gtt gtc tcg gtc tgg ctg cgc acg cac atg 96
 Lys Phe Asp Thr Ala Glu Val Val Ser Val Trp Leu Arg Thr His Met
 20 25 30
 tgg gtc ccc ttc ctg atg tgc ttc atc tac ctg gtc gtc atc ttc ggc 144
 Trp Val Pro Phe Leu Met Cys Phe Ile Tyr Leu Val Val Ile Phe Gly
 35 40 45
 atc cag tac tac atg gag gac cgc aag gag ttc gat ctg cgc aag ccg 192
 Ile Gln Tyr Tyr Met Glu Asp Arg Lys Glu Phe Asp Leu Arg Lys Pro
 50 55 60
 ctg gcc gcc tgg agc gcc ttc ttg gcc att ttc agc atc ggc gcc tcc 240
 Leu Ala Ala Trp Ser Ala Phe Leu Ala Ile Phe Ser Ile Gly Ala Ser
 65 70 75 80
 atc cgc acc gtg ccc gtc ctg ctc aag atg ctc tac gaa aag ggc acg 288
 Ile Arg Thr Val Pro Val Leu Leu Lys Met Leu Tyr Glu Lys Gly Thr
 85 90 95
 cac cac gtg ctc tgc ggc gac acg cgc aac gac tgg gtc att gac aac 336
 His His Val Leu Cys Gly Asp Thr Arg Asn Asp Trp Val Ile Asp Asn
 100 105 110
 ccg gcc ggc gtc tgg acc atg gcc ttt atc ttt tcc aag att ccc gag 384
 Pro Ala Gly Val Trp Thr Met Ala Phe Ile Phe Ser Lys Ile Pro Glu
 115 120 125
 ctc atc gac acc ctc ttt atc gtg ctc cgc aag cgc aag ctc atc acc 432
 Leu Ile Asp Thr Leu Phe Ile Val Leu Arg Lys Arg Lys Leu Ile Thr
 130 135 140
 ctc cac tgg tac cac cac gtg acc gtg ctc ctg ttc tgc tgg cac gcc 480
 Leu His Trp Tyr His His Val Thr Val Leu Leu Phe Cys Trp His Ala

145	150	155	160	
tgg gcc acc ttt gcg ctc acc ggc atc gtc ttt gcc gcc atc aac gcc				528
Trp Ala Thr Phe Ala Leu Thr Gly Ile Val Phe Ala Ala Ile Asn Ala				
	165	170	175	
tcg gtg cac gcc atc atg tac gcc tat tac gcc ttc acg gcc ctc ggc				576
Ser Val His Ala Ile Met Tyr Ala Tyr Tyr Ala Phe Thr Ala Leu Gly				
	180	185	190	
tac cga cca acc tcg tac gcc atc tac att acg ctc att cag atc atg				624
Tyr Arg Pro Thr Ser Tyr Ala Ile Tyr Ile Thr Leu Ile Gln Ile Met				
	195	200	205	
cag atg gtc gtc ggc acc gcc gtc acc ttt tac att ggc tac gac atg				672
Gln Met Val Val Gly Thr Ala Val Thr Phe Tyr Ile Gly Tyr Asp Met				
	210	215	220	
gcc ttt gtc acg ccg cag ccc ttc cgc ctt gac atg aaa ctc aac tgg				720
Ala Phe Val Thr Pro Gln Pro Phe Arg Leu Asp Met Lys Leu Asn Trp				
	225	230	235	240
gac ccg ctc agc aag ggc gag aac acc gag ccc acc tgc aag ggc gcc				768
Asp Pro Leu Ser Lys Gly Glu Asn Thr Glu Pro Thr Cys Lys Gly Ala				
	245	250	255	
aac tcc tcc aac gcc atc ttc ggc gtc atc atg tac gcc tcg tac ctc				816
Asn Ser Ser Asn Ala Ile Phe Gly Val Ile Met Tyr Ala Ser Tyr Leu				
	260	265	270	
tac ctc ttc tgc ctc ttc ttc tac atg gcc tac ctg cgc ccg aag aag				864
Tyr Leu Phe Cys Leu Phe Phe Tyr Met Ala Tyr Leu Arg Pro Lys Lys				
	275	280	285	
tcg acg ccc gcg gcc aag aag aca aac taa tcgcacacta ccaaacaatc				914
Ser Thr Pro Ala Ala Lys Lys Thr Asn				
	290	295		
ttccactcga cctagaaaaa aaaaaaaaaa aaaaactcga g				955

<210> 6

<211> 297

<212> PRT

<213> *Thaustochytrium*

<400> 6

Val Ile Ser Gly Leu Asp Leu Leu Pro Val Leu Ser Trp Glu Thr Met

1	5	10	15
Lys Phe Asp Thr Ala Glu Val Val Ser Val Trp Leu Arg Thr His Met			
20	25	30	
Trp Val Pro Phe Leu Met Cys Phe Ile Tyr Leu Val Val Ile Phe Gly			
35	40	45	
Ile Gln Tyr Tyr Met Glu Asp Arg Lys Glu Phe Asp Leu Arg Lys Pro			
50	55	60	
Leu Ala Ala Trp Ser Ala Phe Leu Ala Ile Phe Ser Ile Gly Ala Ser			
65	70	75	80
Ile Arg Thr Val Pro Val Leu Leu Lys Met Leu Tyr Glu Lys Gly Thr			
85	90	95	
His His Val Leu Cys Gly Asp Thr Arg Asn Asp Trp Val Ile Asp Asn			
100	105	110	
Pro Ala Gly Val Trp Thr Met Ala Phe Ile Phe Ser Lys Ile Pro Glu			
115	120	125	
Leu Ile Asp Thr Leu Phe Ile Val Leu Arg Lys Arg Lys Leu Ile Thr			
130	135	140	
Leu His Trp Tyr His His Val Thr Val Leu Leu Phe Cys Trp His Ala			
145	150	155	160
Trp Ala Thr Phe Ala Leu Thr Gly Ile Val Phe Ala Ala Ile Asn Ala			
165	170	175	
Ser Val His Ala Ile Met Tyr Ala Tyr Tyr Ala Phe Thr Ala Leu Gly			
180	185	190	
Tyr Arg Pro Thr Ser Tyr Ala Ile Tyr Ile Thr Leu Ile Gln Ile Met			
195	200	205	
Gln Met Val Val Gly Thr Ala Val Thr Phe Tyr Ile Gly Tyr Asp Met			
210	215	220	
Ala Phe Val Thr Pro Gln Pro Phe Arg Leu Asp Met Lys Leu Asn Trp			
225	230	235	240
Asp Pro Leu Ser Lys Gly Glu Asn Thr Glu Pro Thr Cys Lys Gly Ala			
245	250	255	
Asn Ser Ser Asn Ala Ile Phe Gly Val Ile Met Tyr Ala Ser Tyr Leu			

260	265	270	
Tyr Leu Phe Cys Leu Phe Phe Tyr Met Ala Tyr Leu Arg Pro Lys Lys			
275	280	285	
Ser Thr Pro Ala Ala Lys Lys Thr Asn			
290	295		
<210> 7			
<211> 708			
<212> DNA			
<213> Crypthecodinium			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1)..(645)			
<400> 7			
cgg cac gag gta cac atg acc gag aag agg gga ctg cag ttc acg atc			48
Arg His Glu Val His Met Thr Glu Lys Arg Gly Leu Gln Phe Thr Ile			
1	5	10	15
tgc ggc tct act ggt gag ttg gtg cag aat ctc cag gat ggt ccc act			96
Cys Gly Ser Thr Gly Glu Leu Val Gln Asn Leu Gln Asp Gly Pro Thr			
20	25	30	
gcc ttg gcg ttg tgc ctc ttt tgc ttc agc aaa att ccc gag ttg atg			144
Ala Leu Ala Leu Cys Leu Phe Cys Phe Ser Lys Ile Pro Glu Leu Met			
35	40	45	
gac acg gtc ttt ctc atc ttg aag ggc aag aag gtt cgc ttt ttg cag			192
Asp Thr Val Phe Leu Ile Leu Lys Gly Lys Lys Val Arg Phe Leu Gln			
50	55	60	
tgg tac cac cac gct acc gtg atg ctc ttc tgc tgg ttg gca ctg gct			240
Trp Tyr His His Ala Thr Val Met Leu Phe Cys Trp Leu Ala Leu Ala			
65	70	75	80
acg gag tac acc ccg gcc ctc tgg ttc gcg gcc act aac tac ttc gtg			288
Thr Glu Tyr Thr Pro Gly Leu Trp Phe Ala Ala Thr Asn Tyr Phe Val			
85	90	95	
cac tcc atc atg tac atg tac ttc ttc ttg atg acc ttc aag acg gcc			336
His Ser Ile Met Tyr Met Tyr Phe Phe Leu Met Thr Phe Lys Thr Ala			
100	105	110	
gca aag gtc gtg aag ccc att gcc cct ctc atc acc atc atc cag atc			384

Ala Lys Val Val Lys Pro Ile Ala Pro Leu Ile Thr Ile Ile Gln Ile
 115 120 125
 gcc cag atg gtc tgg ggt ctc atc gtc aac ggc atc gcg atc acc act 432
 Ala Gln Met Val Trp Gly Leu Ile Val Asn Gly Ile Ala Ile Thr Thr
 130 135 140
 ttc ttc acc acg ggc gcc tgc cag atc cag tcc gtg acg gtc tac tcg 480
 Phe Phe Thr Thr Gly Ala Cys Gln Ile Gln Ser Val Thr Val Tyr Ser
 145 150 155 160
 gcc att gtg atg tac gct tcg tac ttc tac ctc ttc tcc cag ctc ttc 528
 Ala Ile Val Met Tyr Ala Ser Tyr Phe Tyr Leu Phe Ser Gln Leu Phe
 165 170 175
 ctg gag gca tac gga tcc gct ggc aag aac aag aag aag ctc gcc cgc 576
 Leu Glu Ala Tyr Gly Ser Ala Gly Lys Asn Lys Lys Lys Leu Ala Arg
 180 185 190
 gag ctc tcc cga aag atc tcc gag gct ctc ctg aat agt ggc gac gag 624
 Glu Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu Ala Leu Leu Asn Ser Gly Asp Glu
 195 200 205
 gta gcc aag cac ctc aag tga actgagcgcac ctcatcttgg tctggtccgc 675
 Val Ala Lys His Leu Lys
 210 215
 caaattgccg cgtgcatgtg catgagatgc tgt 708

 <210> 8
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Crypthecodinium

 <400> 8
 Arg His Glu Val His Met Thr Glu Lys Arg Gly Leu Gln Phe Thr Ile
 1 5 10 15
 Cys Gly Ser Thr Gly Glu Leu Val Gln Asn Leu Gln Asp Gly Pro Thr
 20 25 30
 Ala Leu Ala Leu Cys Leu Phe Cys Phe Ser Lys Ile Pro Glu Leu Met
 35 40 45
 Asp Thr Val Phe Leu Ile Leu Lys Gly Lys Lys Val Arg Phe Leu Gln
 50 55 60

Trp Tyr His His Ala Thr Val Met Leu Phe Cys Trp Leu Ala Leu Ala
 65 70 75 80
 Thr Glu Tyr Thr Pro Gly Leu Trp Phe Ala Ala Thr Asn Tyr Phe Val
 85 90 95
 His Ser Ile Met Tyr Met Tyr Phe Phe Leu Met Thr Phe Lys Thr Ala
 100 105 110
 Ala Lys Val Val Lys Pro Ile Ala Pro Leu Ile Thr Ile Ile Gln Ile
 115 120 125
 Ala Gln Met Val Trp Gly Leu Ile Val Asn Gly Ile Ala Ile Thr Thr
 130 135 140
 Phe Phe Thr Thr Gly Ala Cys Gln Ile Gln Ser Val Thr Val Tyr Ser
 145 150 155 160
 Ala Ile Val Met Tyr Ala Ser Tyr Phe Tyr Leu Phe Ser Gln Leu Phe
 165 170 175
 Leu Glu Ala Tyr Gly Ser Ala Gly Lys Asn Lys Lys Lys Leu Ala Arg
 180 185 190
 Glu Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu Ala Leu Leu Asn Ser Gly Asp Glu
 195 200 205
 Val Ala Lys His Leu Lys
 210

<210> 9
 <211> 1054
 <212> DNA
 <213> Thraustochytrium

<220>
 <221> CDS
 <222> (43) .. (858)

<400> 9
 gaattcggca cgagagcgcg cggagcggag acctcggccg cg atg atg gag ccg 54
 Met Met Glu Pro
 1
 ctc gac agg tac agg gcg ctg gcg gag ctc gcc gcg agg tac gcc agc 102
 Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Arg Tyr Ala Ser
 5 10 15 20

tcg gcg gcc ttc aag tgg caa gtc acg tac gac gcc aag gac agc ttc	150
Ser Ala Ala Phe Lys Trp Gln Val Thr Tyr Asp Ala Lys Asp Ser Phe	
25 30 35	
gtc ggg ccc ctg gga atc cgg gag ccg ctc ggg ctc ctg gtg ggc tcc	198
Val Gly Pro Leu Gly Ile Arg Glu Pro Leu Gly Leu Leu Val Gly Ser	
40 45 50	
gtg gtc ctc tac ctg agc ctg ctg gcc gtg gtc tac gcg ctg cgg aac	246
Val Val Leu Tyr Leu Ser Leu Leu Ala Val Val Tyr Ala Leu Arg Asn	
55 60 65	
tac ctt ggc ggc ctc atg gcg ctc cgc agc gtg cat aac ctc ggg ctc	294
Tyr Leu Gly Gly Leu Met Ala Leu Arg Ser Val His Asn Leu Gly Leu	
70 75 80	
tgc ctc ttc tcg ggc gcc gtg tgg atc tac acg agc tac ctc atg atc	342
Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp Ile Tyr Thr Ser Tyr Leu Met Ile	
85 90 95 100	
cag gat ggg cac ttt cgc agc ctc gag gcg gca acg tgc gag ccg ctc	390
Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu Glu Ala Ala Thr Cys Glu Pro Leu	
105 110 115	
aag cat ccg cac ttc cag ctc atc agc ttg ctc ttt gcg ctg tcc aag	438
Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ser Lys	
120 125 130	
atc tgg gag tgg ttc gac acg gtg ctc ctc atc gtc aag ggc aac aag	486
Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val Leu Leu Ile Val Lys Gly Asn Lys	
135 140 145	
ctc cgc ttc ctg cac gtc ttg cac cac gcc acg acc ttt tgg ctc tac	534
Leu Arg Phe Leu His Val Leu His His Ala Thr Thr Phe Trp Leu Tyr	
150 155 160	
gcc atc gac cac atc ttt ctc tcg tcc atc aag tac ggc gtc gcg gtc	582
Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser Ser Ile Lys Tyr Gly Val Ala Val	
165 170 175 180	
aat gct ttc atc cac acc gtc atg tac gcg cac tac ttc cgc cca ttc	630
Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met Tyr Ala His Tyr Phe Arg Pro Phe	
185 190 195	
ccg aag ggc ttg cgc ccg ctt att acg cag ttg cag atc gtc cag ttc	678
Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile Thr Gln Leu Gln Ile Val Gln Phe	
200 205 210	

att ttc agc atc ggc atc cat acc gcc att tac tgg cac tac gac tgc 726
 Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr Ala Ile Tyr Trp His Tyr Asp Cys
 215 220 225

gag ccg ctc gtg cat acc cac ttt tgg gaa tac gtc acg ccc tac ctt 774
 Glu Pro Leu Val His Thr His Phe Trp Glu Tyr Val Thr Pro Tyr Leu
 230 235 240

ttc gtc gtg ccc ttc ctc atc ctc ttt ttc aat ttt tac ctg cag cag 822
 Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu Phe Phe Asn Phe Tyr Leu Gln Gln
 245 250 255 260

tac gtc ctc gcg ccc gca aaa acc aag aag gca tag ccacgtaaca 868
 Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr Lys Lys Ala
 265 270

gtagaccagc agcgcgagg acgcgtgccg cgttatcgcg aagcacgaaa taaagaagat 928

catttgattc aacgaggcta cttgcggcca cgagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 988

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1048

ctcgag 1054

<210> 10

<211> 271

<212> PRT

<213> Thraustochytrium

<400> 10

Met Met Glu Pro Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala
 1 5 10 15

Arg Tyr Ala Ser Ser Ala Ala Phe Lys Trp Gln Val Thr Tyr Asp Ala
 20 25 30

Lys Asp Ser Phe Val Gly Pro Leu Gly Ile Arg Glu Pro Leu Gly Leu
 35 40 45

Leu Val Gly Ser Val Val Leu Tyr Leu Ser Leu Leu Ala Val Val Tyr
 50 55 60

Ala Leu Arg Asn Tyr Leu Gly Gly Leu Met Ala Leu Arg Ser Val His
 65 70 75 80

Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp Ile Tyr Thr Ser

85										90										95																			
Tyr	Leu	Met	Ile	Gln	Asp	Gly	His	Phe	Arg	Ser	Leu	Glu	Ala	Ala	Thr																								
100										105										110																			
Cys	Glu	Pro	Leu	Lys	His	Pro	His	Phe	Gln	Leu	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe																								
115										120										125																			
Ala	Leu	Ser	Lys	Ile	Trp	Glu	Trp	Phe	Asp	Thr	Val	Leu	Leu	Ile	Val																								
130										135										140																			
Lys	Gly	Asn	Lys	Leu	Arg	Phe	Leu	His	Val	Leu	His	His	Ala	Thr	Thr																								
145										150										155										160									
Phe	Trp	Leu	Tyr	Ala	Ile	Asp	His	Ile	Phe	Leu	Ser	Ser	Ile	Lys	Tyr																								
165										170										175																			
Gly	Val	Ala	Val	Asn	Ala	Phe	Ile	His	Thr	Val	Met	Tyr	Ala	His	Tyr																								
180										185										190																			
Phe	Arg	Pro	Phe	Pro	Lys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Ile	Thr	Gln	Leu	Gln																								
195										200										205																			
Ile	Val	Gln	Phe	Ile	Phe	Ser	Ile	Gly	Ile	His	Thr	Ala	Ile	Tyr	Trp																								
210										215										220																			
His	Tyr	Asp	Cys	Glu	Pro	Leu	Val	His	Thr	His	Phe	Trp	Glu	Tyr	Val																								
225										230										235										240									
Thr	Pro	Tyr	Leu	Phe	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Ile	Leu	Phe	Phe	Asn	Phe																								
245										250										255																			
Tyr	Leu	Gln	Gln	Tyr	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Lys	Thr	Lys	Lys	Ala																									
260										265										270																			

<210> 11

<211> 421

<212> DNA

<213> Phytophthora infestans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(279)

<400> 11

cac acc atc atg tac act tac tac ttc gtc agc gcc cac acg cgc aac 48
 His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn

1	5	10	15	
att tgg tgg aag aag tac ctc acg cgc att cag ctt atc cag ttc gtg				96
Ile Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val				
20		25	30	
acc atg aac gtg cag ggc tac ctg acc tac tct cga cag tgc cca ggc				144
Thr Met Asn Val Gln Gly Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly				
35	40	45		
atg cct cct aag gtg ccg ctc atg tac ctt gtg tac gtg cag tca ctc				192
Met Pro Pro Lys Val Pro Leu Met Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu				
50	55	60		
ttc tgg ctc ttc atg aat ttc tac att cgc gcg tac gtg ttc ggc ccc				240
Phe Trp Leu Phe Met Asn Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro				
65	70	75	80	
aag aaa ccg gcc gtg gag gaa tcg aag aag aag ttg taa cggcgcttgt				289
Lys Lys Pro Ala Val Glu Glu Ser Lys Lys Lys Leu				
85	90			
taaaaaagtct aacctcgctg taacagctta aaacacacac acacacaacg ctttgtagag 349				
gaggtaagta gtggcaactc gtgtagaaat gcagcatgcc catcaaatac atcccgtatg 409				
attcatacta ct 421				
<210> 12				
<211> 92				
<212> PRT				
<213> Phytophthora infestans				
<400> 12				
His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn				
1	5	10	15	
Ile Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val				
20	25	30		
Thr Met Asn Val Gln Gly Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly				
35	40	45		
Met Pro Pro Lys Val Pro Leu Met Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu				
50	55	60		
Phe Trp Leu Phe Met Asn Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro				
65	70	75	80	
Lys Lys Pro Ala Val Glu Glu Ser Lys Lys Lys Leu				
85	90			

【図1】

酵母e1o1ペプチド(上列)とヒメツリガネゴケ
(*Physcomitrella patens*) PpPSE1とのアライメント

```

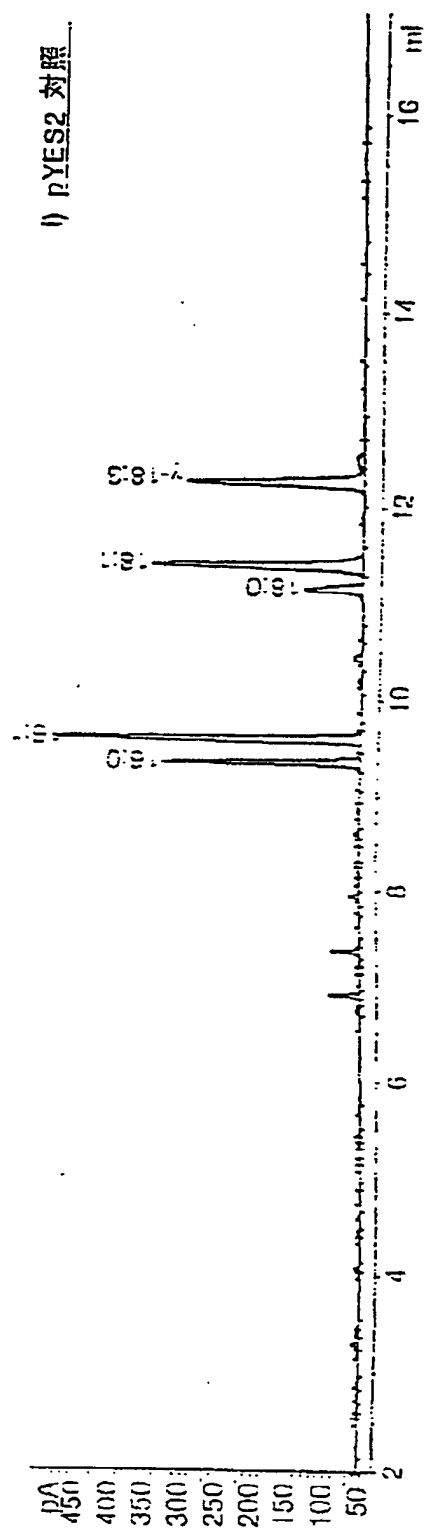
49 dfefvtvgkqplseprpvlffiamyyvvifggrslvk.....sckplkl 91
   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
32 DPTTTKGLPLVDSPTPIVLGVSVYLTIIVIGLLWIKARDLKPRASEPFL 81
   .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .
92 rfisqvhnlmltsvsflwlilmveqmplivyrhglyfavcnveswtqpme 141
   .  .  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
82 QALVLVHNLFCFALSLYMCVGIAYQ..AITWRYSLWGNAYNPKH..KEMA 127
   .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .
142 tlyylnymtkfvefadtvlmvlkh..rkltflhtyhhgatalley...nq 186
   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
128 ILVYLFYMSKYVEFMDTVIMILKRSTRQISFLHVYHHSSISLIWWAIAHH 177
   .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .
187 lvgytawtwvpvtlnlavhvlmywyflsa.....sgirvwwkawvt 228
   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
178 APGGEAY.W.SAALNSGVHVLMYAYYFLAACLRSSPKLKNKYLFWGRYLT 225
   .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .
229 rlqivqfmlldlivvyvlyqkivaayfknactpqcedclgsmtaiaagaa 278
   .  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
226 QFQMFQFMLNLVQAYYDM..KTNAPY.....PQ.....WLIKILFY 259
   .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .
279 ilt sylflfisfyievkyrgsasgkkk 305
   :  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
260 YMISLLFLFGNFYVQKYIKPS.DGKQK

```

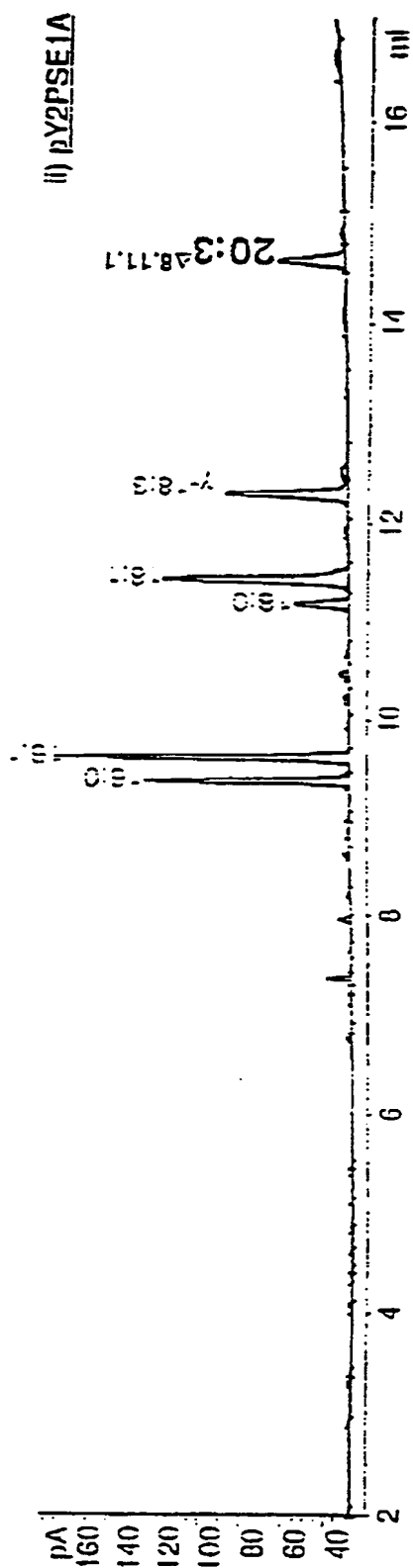
| 同一のアミノ酸

./: 化学的に均等

【図 2 a】

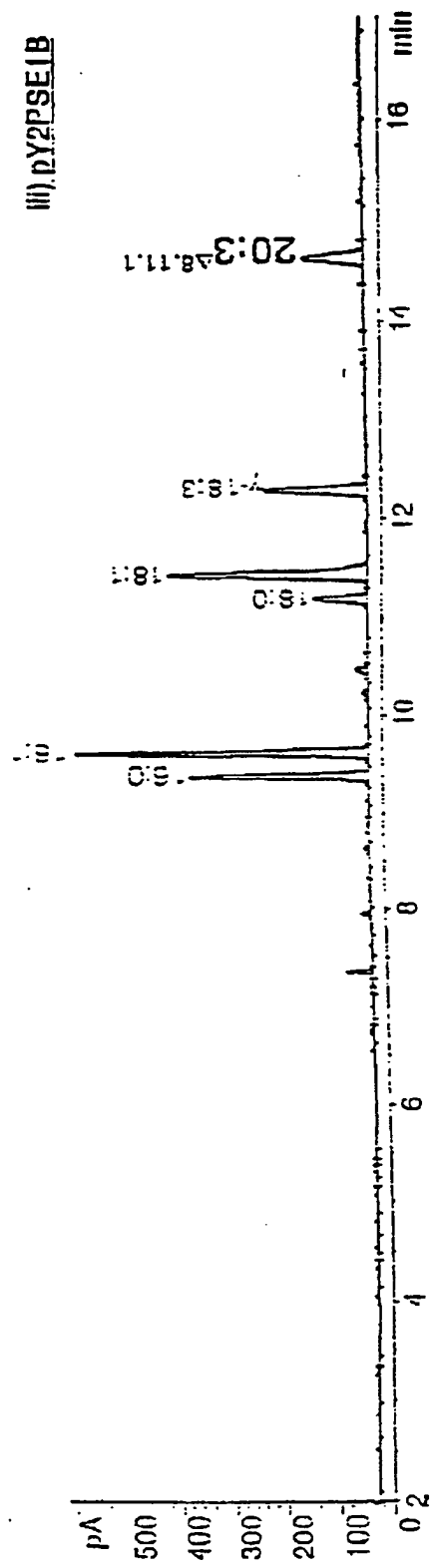


2a

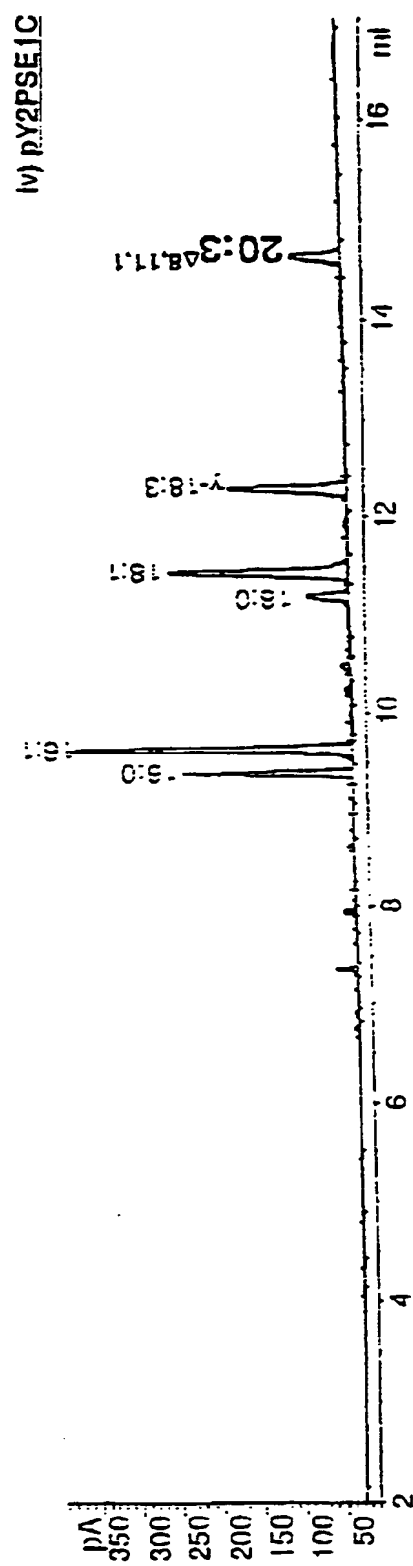


【図 2 b】

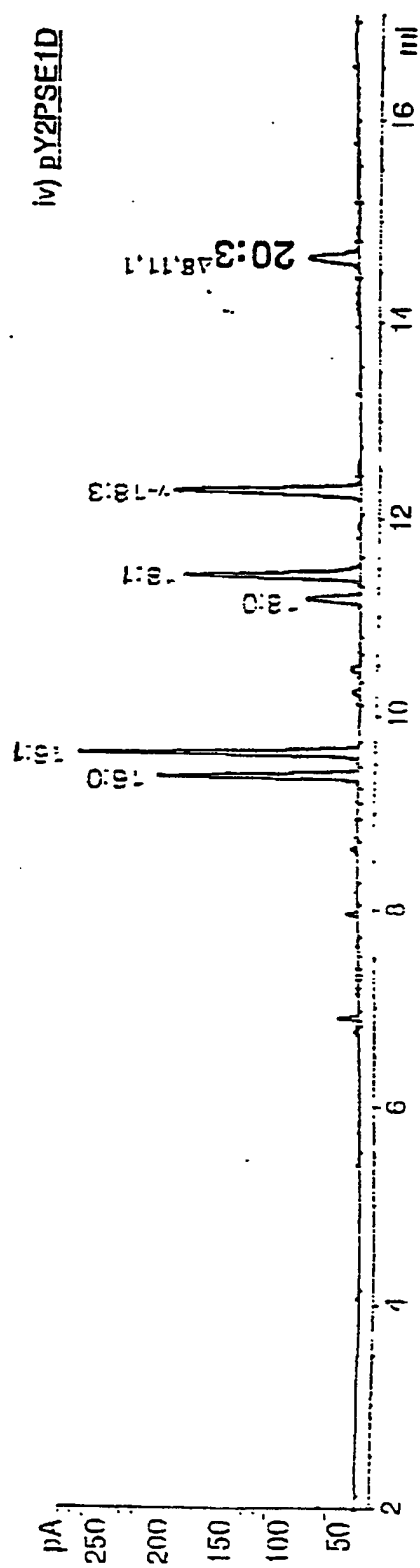
【図 2 c】



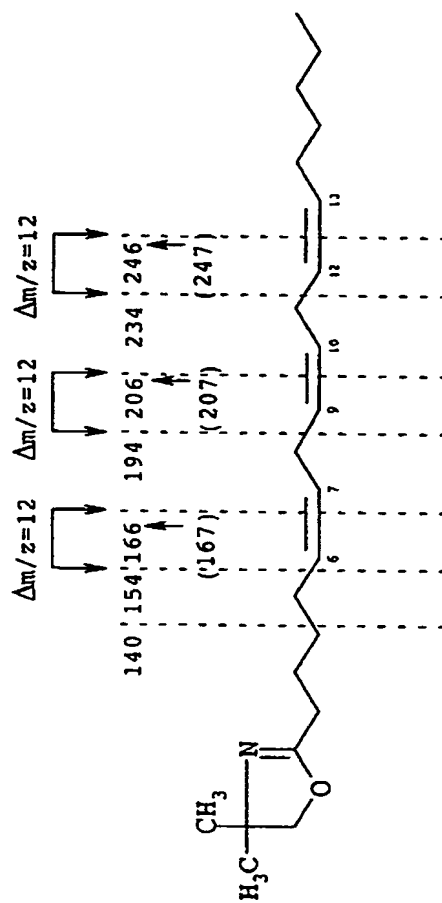
【図2d】



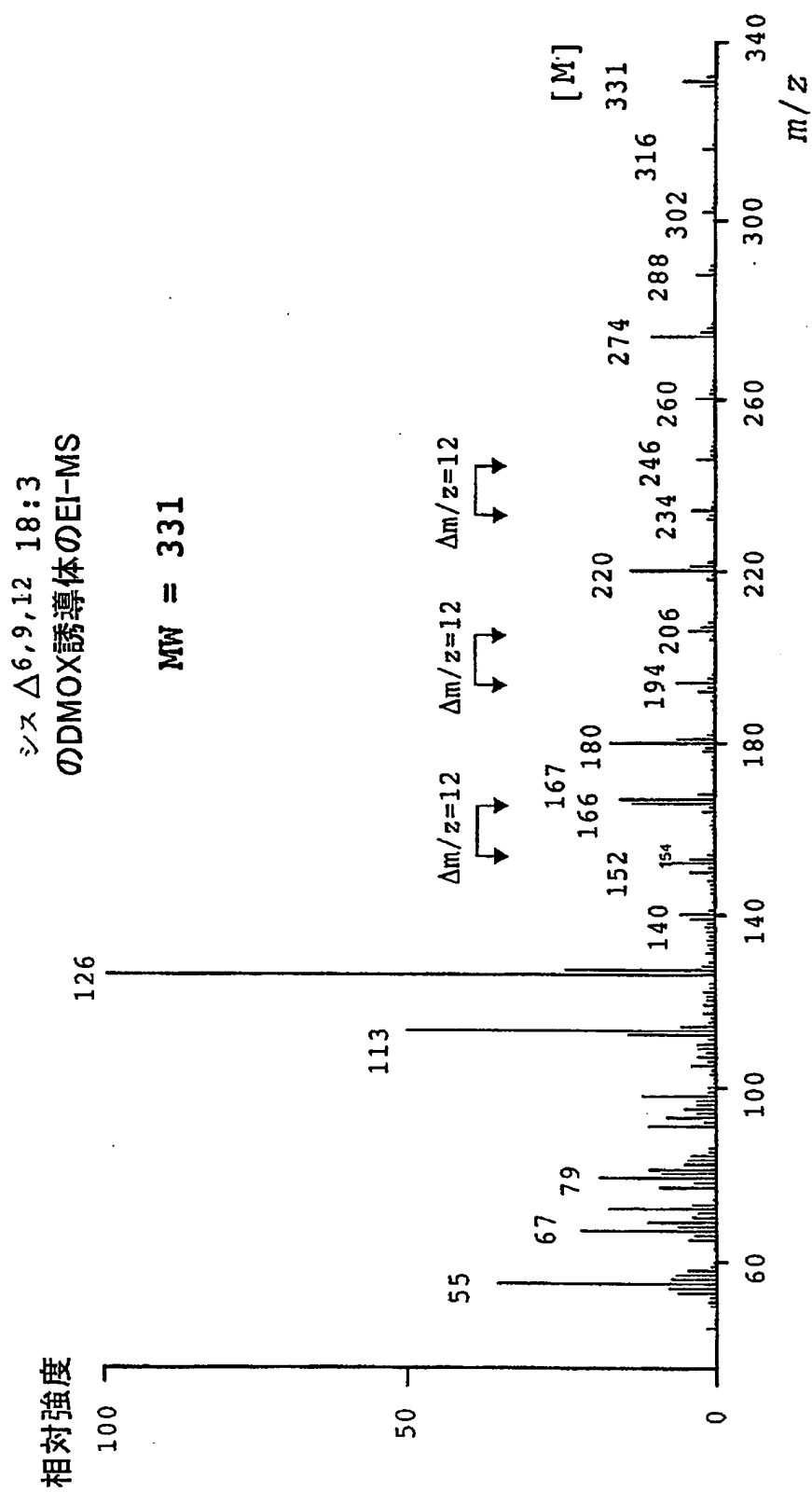
【図2e】



【図3a】

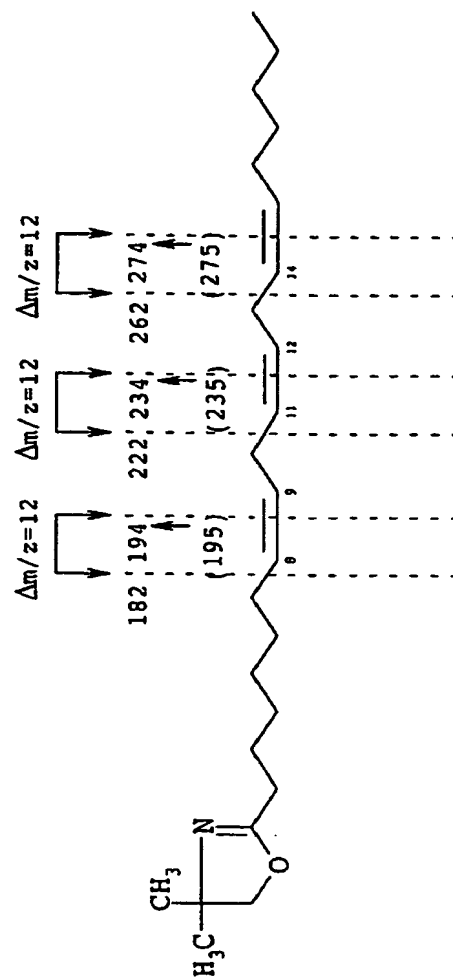
3a: シス $\Delta^{6,9,12}$ 18:3 のDMOX誘導体のシス $\Delta^{6,9,12}$ 18:3
のDMOX誘導体のEI-MS

【図3b】

3b: シス $\Delta^{6,9,12}$ 18:3 のDMOX誘導体のマススペクトル

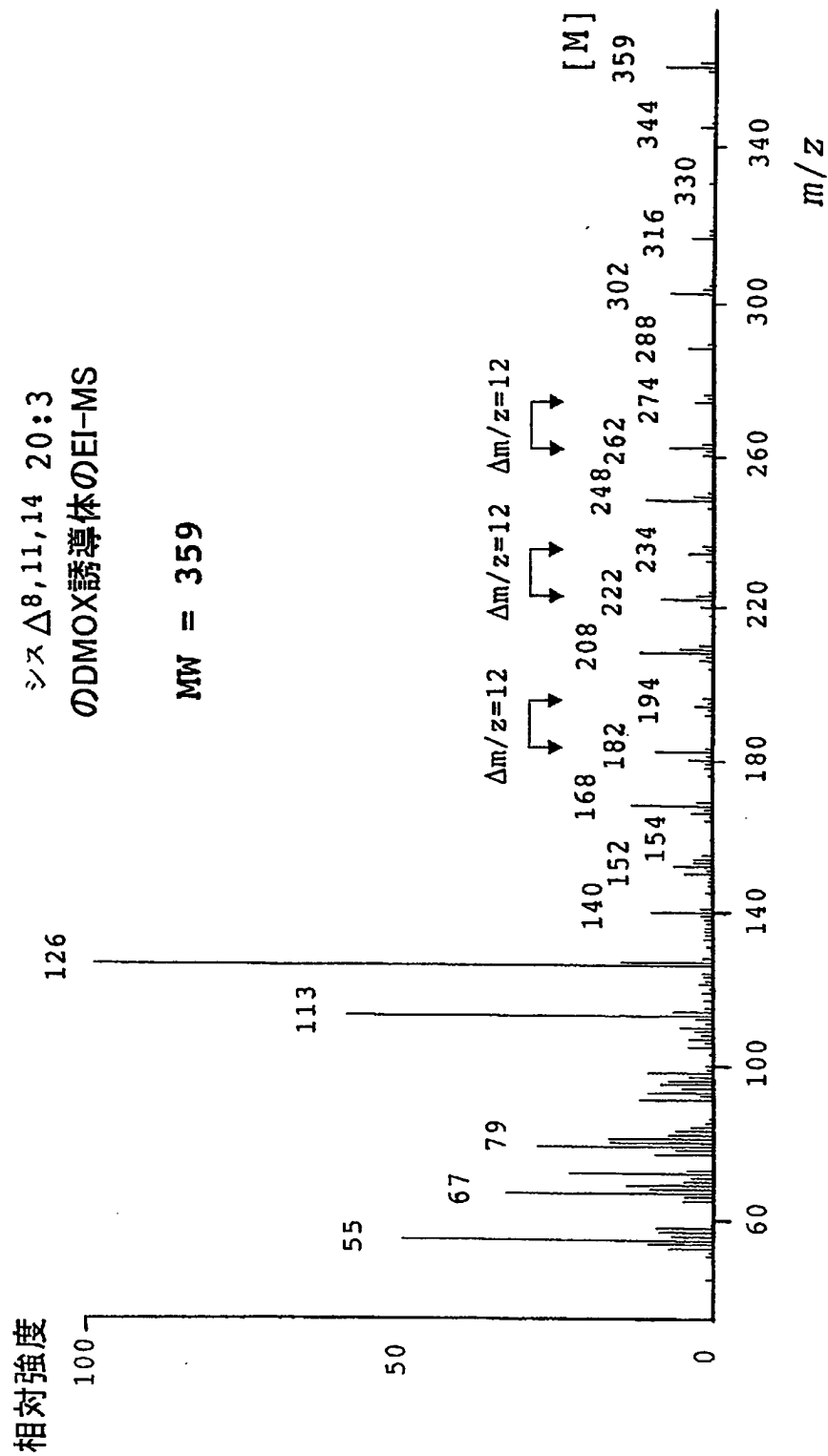
4a: シス $\Delta^{8,11,14}$ 20:3 のDMOX誘導体

シス $\Delta^{8,11,14}$ 20:3
のDMOX誘導体のEI-MS



【図 4 b】

4b: シス $\Delta^{8,11,14}$ 20:3 のDMOX誘導体



pp_PSE1: KHKEMAILVYLFYMSKYVEFMDTVIMILKRSTRQISFLHVYHHSSISLIWIAIAHHAPGG
KH ++ LF +SK E+ DTV++I+K + ++ FLHV HH++ W H
Tc_PSE1: KHPHFQLISLLFALSKIWEFDTVLLIVKGN--KLRFHLVHLHHATT-FWLYAIDHIFLS

pp_PSE1: EAYWSAALNSGVHVLMYAYYFLAACLRSSPKLKNKYLFWGRYLTQFQMFQFMLNL-----
+ A+N+ +H +MYA+YF R PK + TQ Q+ QF+ ++
Tc_PSE1: SIKYGVAVNAFIHTVMYAHYF-----RPFPGKGLRPLI-----TQLQIVQFIFSIGIHTA

pp_PSE1: VQAYYDMKTNAPYPQWLKILFYYMISLLFLFGNFYVQKYI
+ +YD + W + +++ L LF NFY+Q+Y+
Tc_PSE1: IYWHYDCPEPLVHTHFWEYVTPYLFVVPFLILFLNFYLQQYV

【図6】

Pp_PSE1:	LNSGVHVLNMYAYYFLAA
	+N+VH +MYAYY A
Tc_PSE2:	INASVHAINMYAYYAFTA

Pp_PSE1:	AILVYLFYMSKYVEFMDTVIMILKRSTRQISFLHVYHHSSISLIWN-AIA-HHAPGGEAY A+ + LF SK E MDTV +ILK +++ FL YHH+++ L W A+A + PG
Cc_PSE1:	ALALCLFCFSKIPELMDTVFLILKG--KKVRFLQWYHHATVMLFCWLALATEYTPG---L
Pp_PSE1:	WSAALNSGVHVLMYAYYFL 203 W AA N VH +MY Y+FL
Cc_PSE1:	WFAATNYFVHSIMYMYFFL 339

【図8】

ポリペプチド配列Pp_PSE1とTc_PSE2とのアライメント

```

Pp_PSE1: 1 MEVVERFYGELDGKVSQGVNAL.LGSFGVELTDTPTTKGLPLVDSPTPIV 49
          | |..|.|.      ||      .|
Tc_PSE2: 1 .....VISGLDLLPVLVSWETMKFDTAEVVSVWLRTHMWVPF 36

          .       .       .       .
50 LGVSVYLTIVIGLLWIKAR...DL.KPRASEPFLLQALVLVHNLFCFAL 95
    | :|| :: | :..| || |||.      |. :.:
37 LMCFIYLVVIFGIQYYMEDRKEFDLRKPLAA....WSAFLAIFSIGASIR 82

          .       .       .       .
96 SLYMCVGIAYQAITWRYSLWGNAYNP..KHKEMAILVYLFYMSKYVEFMD 143
    .. . . |: | :|. |      : | |||.
83 TVPVLLKMLYEKGT.HHVLCGDTRNDWVIDNPAGVWTMAFIFSKIPELID 131

          .       .       .       .
144 TVIMILKRSTRQISFLHVVHSSISLI.WWAI AHAPGGEAYWSAALNSG 192
    |. .:|:: |. : || |||. :| ||| | | : ||:|.
132 TLFIVLRK..RKLITLHWYHHVTVLLFCWHAWATFALTGIVF..AAINAS 177

          .       .       .       .
193 VHVLMYAYYFLAACLRSSPKLKNKYLFWGRYLTQFQMFQFMLNLVQAY.. 240
    || :|||| | | | | | :| |. | .. :
178 VHAIMYAYYAFTA.LGYRP...TSYAI...YITLIQIMQMVVGTAFTFYI 220

          .       .       .       .
241 .YDMKTNAPYP.....QW...LIK.....ILFYIMI..S 263
    ||| | | | | | | :| .. |
221 GYDMAFVTPQPFR LDMKLNWDPLSKGENTEPTCKGANSSNAIFGVIMYAS 270

          .       .       .       .
264 LLFLFGNFYVQKYIKPSDGKQKGAKTE. 290
    |:| | |: |:| | |
271 YLYLFCLEFFY MAYLRPKKSTPAAKKTN. 297

```

| 同一のアミノ酸

./: 化学的に均等

【図9】

ポリペプチド配列Cc_PSE1とTc_PSE2との比較

```

      .       .       .       .       .
6  MTEKRGLOFTICGSTGELVQNLQDGPTALALCLFCFSKIPELMDTVFLIL 55
   |  .:|   :|| |   . | |   .   | ||||| |. ||. : : |
90 MLYEKGTHHVLCGDTRN..DWVIDNPAGVWTMAFIFSKIPELIDTLFIVL 137
      .       .       .       .       .
56 KGKKVRFLQWYHHATVMLFCWLALATEXTPGLWFAATNYFVHSIMYMYFF 105
   : :|. | |||| ||: ||| | ||   | : ||| | ||. ||| | :
138 RKRKLITLHWYHHVTVLLFCWHAWATFALTGIVFAAINASVHAIMYAYY. 186
      .       .       .       .       .
106 LMTFKTAAKVVVKPIAPLITIIQIAQMVGWGLIVN.....GIAITT...F.. 145
     |           | ||: ||| ||| | |   . | | | |
187 ..AFTALGYRPTSYAIYITLIQIQMVVGTAFTFYIGYDMAFVTPQPFRL 234
      .       .       .       .       .
146 .....FTTGACQ.IQSVTVYSAIVMYASYFYLFSQLFLEAY 180
     | |. |   : : |||| | || | ||
235 DMKLNWDPLSKGENTEPTCKGANSSNAIFGVIMYASYLYLFLCLFFY MAY 283

```

| 同一のアミノ酸

./: 化学的に均等

【図10】

	モチーフ 1	モチーフ 2	モチーフ 3	モチーフ 4
Pp_PSE1		FLHVVHH	LMYAYYF	FGNFYVQ
Tc_PSE1		FLHVLHH	LMYAHYF	FLNFYVQ
Tc_PSE2	FSKIPEL	TLHWYHH	IMYAYFF	
Cc_PSE1	FSKIPEL	FLQWYHH	IMYMYFF	

コンセンサス : FSKIPEL

変化 :

FLHWYHH

T QVL

LMYAYYF FGNFYVQ

I MHF L L

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT						International Application No. PCT/EP 01/01346
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/54 C12N15/82 C12N9/10 A01H5/00 C07K16/40 C12P7/64 C11B1/00 C11C1/00 G01N33/573 C12Q1/48 A61K38/45 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC						
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12P A01H C11B C11C G01N C12Q A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages					Relevant to claim No.
X	MILLAR A AND KUNST L: "Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme" PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 12, no. 1, 1997, pages 121-131, XP002125076 ISSN: 0960-7412 the whole document					1,3,5,6, 9-24,26, 27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.						
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.						
* Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art 'S' document member of the same patent family						
Date of the actual completion of the international search					Date of mailing of the international search report	
16 August 2001					28/08/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010					Authorized officer Oderwald, H	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/01346

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMEST 'Online! EMBL Heidelberg; AC/ID AW156099, 9 November 1999 (1999-11-09) QUATRANO R ET AL.: "ga22h08.y1 Moss EST library PPU Physcomitrella patens cDNA clone" XP002174837 abstract	1-6, 10-12, 15,26,27
X	WO 98 46764 A (THURMOND JENNIFER ;CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUJZON DEBO) 22 October 1998 (1998-10-22) cited in the application the whole document	7,8, 22-25
P,X	ZANK T K ET AL: "Cloning and functional expression of the first plant fatty acid elongase specific for DELTA6-polyunsaturated fatty acids." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 28, no. 6, December 2000 (2000-12), pages 654-658, XP002174836 ISSN: 0300-5127 the whole document	1-6, 9-12, 14-19, 21-24, 26,27
P,X	WO 00 12720 A (ABBOTT LAB) 9 March 2000 (2000-03-09) the whole document	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/01346

Additional matter PCT/ISA/210

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1-28 (in part)

Isolated nucleic acid with SEQ ID NO: 1, which codes for a PUFA (polyunsaturated fatty acid)-specific elongase from *Physcomitrella patens* (SEQ ID NO: 2); Amino acid sequence coded by said nucleic acid; gene construct, vector, organism, antibody, antisense nucleic acid molecule, method for preparing PUFA's, oils, lipids or fatty acids, uses, compositions, kit and method for identifying an antagonist or agonist comprising said nucleic acid and amino acid sequence.

2. Claims Nos. 1-28 (in part)

Analogous to Invention No. 1, but comprising a PUFA elongase from *Thraustochytrium* (SEQ ID NO: 3-6).

3. Claims Nos. 1-28 (in part)

Analogous to Invention No. 1, but comprising an elongase from *Crypthecodinium* (SEQ ID NO: 7 and 8).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 01/01346

Continuation of Field 1.2

Claims Nos. 26, 27 (in part)

Relevant Patent Claims Nos. 26 and 27 relate, in part, to products/compounds respectively characterized by a worthwhile peculiarity or quality, namely an antagonist or agonist of elongases. The Patent Claims thus comprise all products, etc., which have this peculiarity or quality, whereas the description of the patent application does not provide any support for such products, etc. under the terms of PCT Article 5. In the case in question, the patent claims lack the corresponding support and the patent application lacks the necessary disclosure to such a degree that a meaningful search appears to be impossible to conduct with respect to the entire scope for which protection is sought. Nevertheless, the patent claims also lack the clarity required in PCT Article 6, whereby an attempt was made to define the products/compounds in terms of the respectively desired outcome. This absence of clarity is such that it makes it impossible to conduct a meaningful search with respect to the entire scope for which protection is sought. For this reason, the search was directed at the portions of the patent claims which can be regarded as clear, supported or disclosed in the above-mentioned sense, namely at the portions conducted.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). Similar to the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 Int. Application No
 PCT/EP 01/01346

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846764 A	22-10-1998	US 5972664 A	26-10-1999
		US 6075183 A	13-06-2000
		US 5968809 A	19-10-1999
		US 6051754 A	18-04-2000
		AU 720677 B	08-06-2000
		AU 7114798 A	11-11-1998
		AU 720725 B	08-06-2000
		AU 7114898 A	11-11-1998
		BG 103796 A	31-05-2000
		BG 103798 A	31-05-2000
		BR 9808506 A	23-05-2000
		BR 9809083 A	01-08-2000
		CN 1253587 T	17-05-2000
		CN 1253588 T	17-05-2000
		EP 0996732 A	03-05-2000
		EP 1007691 A	14-06-2000
		HU 0001295 A	28-07-2000
		NO 994924 A	30-11-1999
		NO 994926 A	30-11-1999
		PL 336067 A	05-06-2000
		PL 336077 A	05-06-2000
		SK 139799 A	16-05-2000
		SK 139999 A	16-05-2000
		TR 9902466 T	21-07-2000
		TR 9902474 T	21-02-2000
		WO 9846765 A	22-10-1998
		AU 726807 B	23-11-2000
		AU 6961698 A	11-11-1998
		BG 103797 A	28-04-2000
		BR 9808507 A	23-05-2000
		CN 1252099 T	03-05-2000
		EP 0975766 A	02-02-2000
		HU 0001236 A	28-07-2000
		NO 994925 A	30-11-1999
		PL 336143 A	05-06-2000
		SK 139899 A	16-05-2000
		TR 9902465 T	21-01-2000
		WO 9846763 A	22-10-1998
		US 6136574 A	24-10-2000
		HU 0001517 A	28-08-2000
WO 0012720 A	09-03-2000	AU 5696499 A	21-03-2000
		EP 1108039 A	20-06-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)	
A 2 3 L	1/30	A 6 1 K	7/00	C 4 B 0 6 3
A 6 1 K	7/00		31/201	4 B 0 6 4
	31/201		31/202	4 C 0 8 3
	31/202	A 6 1 P	3/02	4 C 2 0 6
A 6 1 P	3/02		3/06	4 H 0 4 5
	3/06		9/10	4 H 0 5 9
	9/10		29/00	
	29/00	C 0 7 K	16/40	
C 0 7 K	16/40	C 1 1 C	3/00	
C 1 1 C	3/00	C 1 2 N	9/00	
C 1 2 N	9/00	C 1 2 P	7/64	
C 1 2 P	7/64	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 N	15/00	Z N A A

(31)優先権主張番号 1 0 0 6 3 3 8 7. 0

(32)優先日 平成12年12月19日(2000. 12. 19)

(33)優先権主張国 ドイツ (DE)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, G M, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, B Z, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, J P, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ツェーリンガー, ウルリッヒ

ドイツ連邦共和国 23845 ボルステル,
バーカリー 22

(72)発明者 ラーヘル, イェンス

ドイツ連邦共和国 68526 ラーデンプル
ク, イン ステグ 36

(72)発明者 レンツ, アンドレアス

ドイツ連邦共和国 67117 リンバーガー
ホフ, ハインリッヒ-フォン-クライスト
-シュトラッセ 6

F ターム(参考) 2B030 AD08 CA14 CA15 CA17 CA19
2B150 AC37 DA37 DD31
4B018 MD10 MD15 ME04 MF13
4B024 AA01 AA05 AA10 BA07 CA04
DA05 EA04 GA11 HA12 HA15
4B050 CC03 DD03 DD13 LL05
4B063 QA18 QQ95 QR20 QR59 QR80
QS24 QS28
4B064 AD88 CA19 CC24 DA01 DA10
4C083 AC251 BB11 CC01 EE12
FF01
4C206 AA01 AA03 AA04 DA04 DA05
MA01 MA04 NA14 ZA36 ZB11
ZC21 ZC33
4H045 AA11 CA10 CA15 CA30 DA76
DA89 EA50 FA72
4H059 BA26 BA33 BB04 BB05 BB06
BC48